

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROSEMEIRE CARVALHO DA SILVA

**ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA
AVALIAÇÃO DE SEMENTES DE *HELIANTHUS ANNUUS* L.**

CURITIBA

2012

ROSEMEIRE CARVALHO DA SILVA

**ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA
AVALIAÇÃO DE SEMENTES DE *HELIANTHUS ANNUUS* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maristela Panobianco Vasconcellos
Co-orientador: Dr. José de Barros França Neto

CURITIBA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **ROSEMEIRE CARVALHO DA SILVA**, sob o título "**ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIA DO TESTE DE TETRAZÓLIO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE *Helianthus annuus* L.**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 29 de Fevereiro de 2012.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio
Coordenadora do Programa

Dr. Osmar Paulo Beckert
Primeiro Examinador

Professora Dra. Claudete Reisdörfer Lang
Segunda Examinadora

Professora Dra. Maristela Panobianco Vasconcellos
Presidente da Banca e Orientadora

Dedico

Aos meus pais, Dirceu Carvalho da Silva (*in memorian*) e Vilma Falavigna da Silva, em agradecimento por terem me proporcionado à vida, pela educação exemplar e pelo apoio incondicional nas decisões por mim tomadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que de sua forma onipotente e onipresente me guiou e proporcionou experiências únicas em todos os momentos de minha vida.

À minha mãe, Vilma Falavigna da Silva e à minha irmã, Rosangela Carvalho da Silva, pelo amor e apoio em todos os momentos de dificuldades por mim enfrentados.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Maristela Panobianco, pelo crédito, incentivo e exemplar orientação durante todo o processo de execução do trabalho.

Ao Dr. José Barros França Neto, pesquisador da Embrapa Soja, que emprestou seu conhecimento na co-orientação do trabalho.

Ao Sr. Augusto Martinelli, por contribuir com sua experiência de forma fundamental para a execução inicial da pesquisa.

À Casa da Estudante Universitária de Curitiba, não apenas por ter me proporcionado “Um Lar em Terra Estranha”, como é o seu lema, mas também pela valiosa experiência de vida, e pela possibilidade de encontrar e construir muitas das minhas eternas amizades, em especial às moradoras do quinto andar, onde residi durante o período de 2003 a 2009, principalmente às minhas companheiras de quarto “veia” Andressa, Andréia, Juliana, Cláudia, Tereza e Marília, que durante o período em que convivemos contribuíram de maneira única para meu crescimento espiritual e pessoal.

A todos os mestres e técnicos do curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal do Paraná - UFPR, em especial aqueles do programa de pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal, que contribuíram para minha formação e possibilitaram a execução e conclusão deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, em especial a Embrapa Soja, pela concessão das sementes utilizadas na pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

A toda equipe do Laboratório de Análise de Sementes da Empresa Paranaense de Classificação de Produtos – CLASPAR, Curitiba, pelo apoio em todos os momentos necessários.

A toda equipe do Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR, os estagiários Anderson, Bruna, Fábio e Nogueira, aos companheiros de trabalho Alex, Camila, Grasiela, Luciane, Mariana, Sibelle e Tereza Cristina, e a técnica do Laboratório Roseli do Rocio Biora, que pelo apoio, amizade e partilha de suas experiências pessoais e profissionais, proporcionaram ótimo ambiente de convivência, contribuindo de forma singular na construção e conclusão deste trabalho.

RESUMO

O girassol pode apresentar elevado grau de dormência em sementes recém colhidas, o que dificulta a avaliação do seu potencial fisiológico por métodos dependentes da germinação e desenvolvimento de plântulas. O teste de tetrazólio (TZ) é um teste bioquímico, baseado na atividade respiratória da semente, rápido e não influenciado pela dormência. O referido teste tem sido incorporado em programas de controle de qualidade interno de muitas empresas, principalmente para espécies em que a metodologia do teste tenha sido adaptada. A metodologia do TZ para estimativa da viabilidade e do vigor de sementes de girassol ainda não está consolidada. Assim, o presente trabalho teve por objetivo determinar procedimentos eficientes para a condução do teste de tetrazólio em sementes de girassol. Foram selecionados quatro lotes da cultivar BRS122, avaliados inicialmente quanto ao grau de umidade, germinação e emergência de plântulas em campo. Para o estudo do TZ-viabilidade, testou-se: procedimentos para extração do pericarpo e tegumento; hidratação direta em água por 16 e 18 h sob temperatura de 25°C; coloração em solução de tetrazólio nas concentrações de 0,1 e 0,5% por períodos de 2, 3 e 4 h; e concentração de 1,0% nos períodos de 1, 2 e 3 h, mantidos sob temperatura de 30 °C. A avaliação do TZ-viabilidade em sementes de girassol pode ser realizada com hidratação das sementes por imersão em água, durante 16 h, a 25 °C; com retirada do pericarpo e tegumento, realizando-se corte longitudinal entre os cotilédones de até 1/3 o comprimento do aquênio; coloração por imersão em solução de tetrazólio a 0,1%, por 3 h, a 30 °C. Para condução do TZ-vigor as sementes devem ser submetidas à hidratação direta em água por 16 h, a 25 °C, e coloridas na solução de tetrazólio na concentração de 0,1% por 3 h a 30 °C. Em função dos resultados, foram obtidas cinco classes de qualidade: viáveis de alto vigor, viáveis de médio vigor, viáveis de baixo vigor, não viáveis e mortas. Concluiu-se que o teste de tetrazólio é eficiente na avaliação da viabilidade e vigor de sementes de girassol.

Palavras-chave: Dormência; viabilidade e vigor.

ABSTRACT

The sunflower can demonstrate high degree of dormancy in freshly harvested seeds, which difficult to assess their physiological potential by methods dependent on the germination and seedling development. The tetrazolium test (TZ) is a biochemical test based on the respiratory activity of seeds, independent of the seeds germination which makes it a fast and not influenced by the seed dormancy. This test has been often used in programs of internal quality control of many companies especially for those crops in which the testing methodology has been adapted. The methodology for estimating the viability and vigour by the TZ of sunflower seeds is not yet standardized. This study aimed to establish efficient procedures for the conduct of the tetrazolium test in sunflower seeds. Four lots of sunflower seeds were used, which were evaluated for moisture content, germination and seedling field emergence. For the TZ-viability study, some procedures were evaluated: best procedure for extraction of the pericarp and seed coat; hydration by immersion in water for 16 and 18 h at 25 ° C, staining in tetrazolium solution at concentrations of 0.1% and 0.5% for 2, 3 and 4 h at 30 ° C; and staining in tetrazolium solution at 1.0% for 1, 2 and 3 h at 30 ° C. The assessment of viability in TZ-sunflower seeds can be performed with the seeds hydrated by immersion in water during 16 h at 25 ° C, with removal of the pericarp and seed coat, performing longitudinal section between the cotyledons up to 1 / 3 the length achene and coloring by immersion in tetrazolium solution 0.1%, for 3 h at 30 ° C. For conducting of the TZ-vigour the seeds were directly hydrated in water for 16 h at 25 ° C, and they were colored at tetrazolium solution in the concentration of 0.1% for 3 h at 30 ° C. By the resulted were obtained five quality classes: viable and high vigour, viable and medium vigour, viable and low vigour, non-viable and dead. It was concluded that the tetrazolium test is effective in assessing the viability and vigor of sunflower seeds.

Keywords: Dormancy; viability and vigour.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Cultura do girassol	13
2.2. Dormência de sementes	14
2.3. Qualidade fisiológica da semente	17
2.4. Teste de tetrazólio	19
3. CAPÍTULO I - VIABILIDADE DE SEMENTES DE GIRASSOL AVALIADA PELO TESTE DE TETRAZÓLIO	24
3.1. INTRODUÇÃO	26
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.4. CONCLUSÃO	34
3.5. AGRADECIMENTOS	34
3.6. REFERÊNCIAS	35
4. CAPÍTULO II - VIGOR DE SEMENTES DE GIRASSOL DETERMINADO PELO TESTE DE TETRAZÓLIO	44
4.1. INTRODUÇÃO	46
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.4. CONCLUSÃO	51
4.5. AGRADECIMENTOS	51
4.6. REFERÊNCIAS	52
5. COONCLUSÕES GERAIS	56
6. REFERÊNCIAS GERAIS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do grau de umidade inicial (UI) e final (UF) após 16 e 18 horas, teste de germinação (G), e emergência de plântulas em campo (EC) dos lotes de sementes de girassol da cultivar BRS 122.....	40
Tabela 2: Viabilidade de sementes de girassol pelo teste de tetrazólio, com 16 e 18 h de hidratação, sob diferentes períodos de coloração em solução de tetrazólio na concentração de 0,1% a 30 °C.	42
Tabela 3: Viabilidade de sementes de girassol pelo teste de tetrazólio, com 16 e 18 horas de hidratação, sob diferentes períodos de coloração em solução de tetrazólio na concentração de 0,5% a 30 °C.	42
Tabela 4: Viabilidade de sementes de girassol pelo teste de tetrazólio, com 16 e 18 horas de hidratação, sob diferentes períodos de coloração em solução de tetrazólio na concentração de 1,0% a 30 °C.	43
Tabela 5: Resultados médios do grau de umidade inicial (GU _i) e após 16 h de hidratação (GU _h), da germinação (G) e da emergência de plântulas em campo (EC), de quatro lotes de sementes de girassol da cultivar BRS122.....	54
Tabela 6: Resultados do teste de tetrazólio viabilidade (TZ-VB) e vigor (TZ-V) de sementes de girassol após 16 horas de hidratação e coloração em solução na concentração de 0,1% por três horas, a 30 °C.	54
Tabela 7: Resultados da correlação de Spearman entre o TZ-Viabilidade (TZ-VB) e Germinação (G), e entre TZ-Vigor (TZ-V) e emergência de plântulas em campo (EC).....	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** **A)** seqüência do corte e retirada do pericarpo e tegumento com a exposição do embrião; **B)** corte longitudinal entre os cotilédones e exposição da face interna dos cotilédones, e eixo embrionário (aumento de 1,6x no microscópio estereoscópico), com ênfase nas regiões vitais do embrião, sendo (v) vaso de condução central em um dos cotilédones, (p) plúmulas seccionada ao meio, (c) cilindro central e (e) eixo hipocótilo-radícula. 40
- Figura 2:** Aspectos observados nas sementes de girassol submetidas ao teste de tetrazólio. **A)** Classe 1 sementes viáveis (1 – 8), **B)** Classe 2 sementes não viáveis (9 – 12) e **C)** Classe 3 sementes mortas (13 – 16). 41
- Figura 3:** Classes de vigor obtidas pelo teste de tetrazólio para sementes de girassol (aumento de 1,6x no microscópio estereoscópico): **(A)** Classe 1 sementes de alto vigor (1-5); **(B)** Classe 2 sementes de médio vigor (6-10); **(C)** Classe 3 sementes de baixo vigor (11-15); **(D)** Classe 4 sementes não viáveis (16-20); **(E)** Classe 5 sementes mortas (21-25). 55

1. INTRODUÇÃO GERAL

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma espécie oleaginosa nativa da América do Norte, com destaque no cenário nacional e internacional pela produção de óleo comestível de alta qualidade, rico em ácidos graxos essenciais. Além disso, a cultura é considerada fonte alternativa para produção de biocombustível (Rossi, 1998; Dall'Agnol et al., 2005).

Na agricultura moderna é cada vez mais exigida a qualidade dos insumos e, sabendo-se que a semente é um dos principais insumos investidos no empreendimento agrícola, a indústria sementeira tem introduzido programas de controle de qualidade nas diferentes etapas que envolvem a produção de sementes (McDonald, 1998; TeKrony, 2003; Marcos Filho, 2005).

O teste de germinação é o mais frequentemente utilizado na avaliação da viabilidade das sementes, determinando o potencial máximo de germinação de um lote, fornecendo informação sobre o valor das sementes para semeadura e gerando subsídio para diferenciação da qualidade dos lotes de sementes. Porém, o teste necessita de um tempo considerável para sua condução, sendo que no caso do girassol este período pode atingir até 10 dias (Brasil, 2009). Adicionalmente, sua avaliação é influenciada pelo grau de dormência das sementes de girassol recém colhidas (Rossi, 1998; Marcos Filho et al., 1987; Bianco et al., 1994), necessitando de tratamentos específicos para superação da dormência, prolongando assim a duração do teste.

Neste sentido, destaca-se o teste de tetrazólio, considerado completo por ser rápido (resultados em menos de 24 horas), confiável (análise individual da semente), possibilitar a avaliação da viabilidade e do vigor, além de não ser influenciado pela dormência da semente (Marcos Filho, 2005). Por essas vantagens, o tetrazólio tem sido incluído em programas de controle de qualidade interno de empresas produtoras de sementes, adotado principalmente para espécies que já possuem metodologias adaptadas como soja (França Neto et al., 1999), milho (Dias e Barros, 1999), amendoim (Bittencourt e Vieira, 1999), algodão (Vieira e Von Pinho, 1999) e feijão (Bhering et al., 1999). No entanto, conforme ressaltou Marcos Filho (2005) a consistência dos resultados do teste de tetrazólio é dependente do nível de treinamento do analista, o que vincula a eficiência do teste a um constante treinamento da equipe técnica, elevando assim os custos do laboratório.

Para sementes de girassol, existem recomendações nas Regras para Análise de Sementes - R.A.S. (Brasil, 2009) e na International Seed Testing Association - ISTA (ISTA, 2003) com enfoque para viabilidade. As regras brasileiras (Brasil, 2009) abrangem as indicações da ISTA, permitindo assim uma grande amplitude de recomendações, o que dificulta a padronização das avaliações entre laboratórios. Esta amplitude é verificada quanto ao pré-condicionamento das sementes, que pode ser entre papel (por períodos de 15 a 30 horas, a 25 °C) ou por imersão direta em água (por 18 horas, a 20 °C), com variações no tempo de exposição das sementes à solução de tetrazólio (0,5 a 3 horas) e concentração da solução (0,5% e 1%).

No caso da avaliação do vigor pelo teste de tetrazólio, não se encontram na literatura recomendações para sementes de girassol. Os testes de vigor têm grande importância para o controle de qualidade interno das empresas produtoras de sementes, uma vez que a identificação precisa do potencial fisiológico é imprescindível para sua adequada classificação e comercialização (Marcos Filho, 1994; TeKrony, 2003).

Assim, a presente pesquisa teve por objetivo definir a metodologia mais adequada do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de girassol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura do girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma espécie anual herbácea, pertencente à família Asteraceae, classificada como a quarta oleaginosa mais produzida no mundo, ficando atrás da soja, colza e algodão (USDA, 2011a). Os principais produtores são a Rússia, União Européia, Ucrânia, Argentina e Turquia, que juntos detêm mais de 77% da produção mundial (USDA, 2011b).

De seus aquênios (sementes) é extraído óleo comestível com alto valor nutricional e, seu subproduto pode ser utilizado em rações animais como fonte de proteína (Dickmann et al., 2005). Atualmente, a cultura vem sendo empregada como fonte alternativa na produção de biocombustíveis (Dall'Agnol et al., 2005).

No Brasil, o girassol pode ser cultivado durante todo o ano, por possuir boa adaptação às condições climáticas das regiões produtoras de grãos (Rossi, 1998). Assim a cultura tem sido utilizada como alternativa de cultivo antecessor ou em sucessão às grandes culturas tradicionalmente cultivadas, como soja e milho (Lazzarotto et al., 2005), trazendo vantagem para a indústria de óleo, que ao receber mais uma matéria-prima, diminui a ociosidade de máquinas e mão-de-obra nos períodos de entressafra das culturas de verão.

Apesar do Brasil possuir aptidão para produção de girassol em larga escala, há necessidade de experiência, tradição e mercado (Dall'Agnol et al., 2005), sendo que este conjunto de características acarreta uma produção muito aquém da capacidade brasileira.

A estimativa da produção brasileira de girassol na safra de 2010/2011, de 76,7 mil toneladas, revela uma redução de 48% na produção nacional (CONAB, 2011). Apesar de ter ocorrido um crescimento significativo na produção de girassol nas últimas décadas, a cultura ainda está sujeita a oscilações na produção.

Outra questão relevante que tem interferido na expansão do girassol em regiões de aptidão para a cultura é a presença do mofo branco, doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, principalmente em regiões que apresentam temperaturas mais amenas. O cultivo em sucessão com a soja, em regiões onde essa doença está presente, pode

levar a uma incidência de até 100% do campo de girassol, visto que ambas as culturas são altamente suscetíveis à doença (Leite, 2005).

2.2. Dormência de sementes

A dormência caracteriza-se por ser uma estratégia ou mecanismo de sobrevivência e continuidade da espécie em ambientes temporariamente desfavoráveis para seu desenvolvimento e reprodução. É de certa forma uma compensação de sua incapacidade de locomoção espontânea (Dias, 2005).

A dormência é mais do que um simples meio que as sementes possuem para não germinar, é uma característica determinada por fatores genéticos, mas que a sua indução ocorre por estímulos presentes no ambiente (Baskin e Baskin, 1998; Cardoso, 2004). Sementes dormentes são aquelas que mesmo quando fornecidas condições teoricamente adequadas de água, temperatura, luz e oxigênio, não são capazes de ativar completamente o mecanismo metabólico, pois apresentam algum tipo de bloqueio que impede a ocorrência da germinação (Cardoso, 2004; Dias, 2005, Marcos Filho, 2005).

Baskin e Baskin (2004) sugeriram um sistema de classificação internacional para dormência de sementes. De acordo com os autores, a dormência pode ser dividida em classes, níveis e tipos. A proposta segue a divisão da dormência nas seguintes classes: dormência fisiológica, dormência morfológica, dormência morfofisiológica, dormência física e uma combinação entre dormência fisiológica e física.

A dormência também pode ser dividida como: a) endógena, que por sua vez, pode ser subdividida em dormência fisiológica, morfológica e morfofisiológica, onde o bloqueio da germinação está relacionado ao embrião e eventualmente aos tecidos extra-embrionários; b) exógena, que abrange a dormência física, química e mecânica, onde a inibição pode ser proporcionada pelo tegumento, endocarpo, pericarpo e órgãos extraflorais (Baskin e Baskin, 1998; Baskin e Baskin; 2004; Cardoso, 2004).

A dormência fisiológica está subdividida em três níveis: dormência não profunda, intermediária e profunda, sendo que a dormência não profunda é o tipo mais comum nas gimnospermas e nas principais classes das angiospermas. Tanto a dormência não profunda, quanto à intermediária pode ser superada por curto período de exposição ao frio,

armazenamento seco e/ou aplicação exógena de reguladores vegetais em sementes inteiras. No entanto, as sementes que apresentam dormência profunda necessitam de longo período de exposição ao frio e não respondem a tratamentos com reguladores vegetais, sendo necessária a excisão do embrião (Baskin e Baskin, 1998).

Outra forma de caracterizar a dormência é quanto a sua origem: dormência primária ou secundária. Dormência primária é adquirida durante o período de maturação das sementes, podendo ser resposta a estímulos ambientais recebidos pela planta mãe. Este tipo de dormência é considerado um padrão genético da espécie, frequentemente observado independentemente do ano, local e época de produção, sendo comumente relacionada à dormência anterior a dispersão (colheita). Já a dormência secundária é um fenômeno que se instala após a dispersão ou colheita das sementes, sendo observada esporadicamente, ou seja, as sementes geralmente não apresentam dormência na maturidade fisiológica, e a adquire geralmente em resposta a determinados estímulos do ambiente (Cardoso, 2004; Dias, 2005; Marcos Filho, 2005).

A dormência das sementes tem um importante papel ecológico, visto que é uma estratégia adaptativa da espécie vegetal a diferentes ambientes, o que garante a presença e sucessão das mais variadas espécies nos diferentes ecossistemas existentes. Outra questão importante a ser considerada, é que as sementes de uma mesma planta não apresentam a mesma intensidade de dormência, garantindo que a germinação ocorra gradativamente ao longo do tempo, aumentando assim as chances das plântulas se estabelecerem no ambiente (Cardoso, 2004; Dias, 2005).

A dormência em espécies cultivadas nem sempre é desejada, e em sua maioria esta característica foi perdida pela domesticação e sucessivas seleções do melhoramento genético (Marcos Filho, 2005). No entanto, em algumas espécies, esta característica ainda prevalece, e muitas vezes o caminho inverso pode ser realizado, a exemplo do trigo, em que busca-se cultivares que apresentam dormência nas sementes, evitando assim que estas germinem ainda na espiga, uma vez que a germinação na pré-colheita é um dos principais fatores da perda de qualidade industrial do trigo, acarretando na redução do valor comercial da cultura (Santos et al., 2010).

A desvantagem da dormência na agricultura está principalmente relacionada à falha no estande de cultivo, decorrida do atraso da emergência, em razão dos lotes apresentarem diferentes níveis de dormência, o que acarreta heterogeneidade nos estádios fisiológicos da planta, dificultando assim os tratos culturais e até mesmo interferindo no período da colheita.

Além disso, pode favorecer a incidência de plantas invasoras, aumentando a competição destas com as plantas da cultura principal (Cardoso, 2004; Marcos Filho, 2005).

Outra questão relevante sobre as desvantagens da dormência está relacionada à avaliação da qualidade fisiológica em laboratório, visto que sementes dormentes não são capazes de germinar mesmo em ambientes favoráveis, o que impossibilita a realização da maioria dos testes recomendados, necessitando realizar procedimentos para superar a dormência antes da análise, o que nem sempre é possível, pois dependendo da espécie não se tem informação sobre o método mais adequado e eficiente (Cardoso, 2004; Brasil, 2009).

Sabendo-se que o nível de dormência em uma mesma população ou lote não é o mesmo, Marcos Filho (2005) ressaltou que alguns métodos de superação de dormência aplicados nos laboratórios, como exposição ao frio, podem interferir na qualidade das sementes que não apresentam dormência, alterando o resultado final da avaliação. Demonstrando a necessidade de aprimoramento de testes que não são influenciados pela dormência das sementes, diminuindo os problemas anteriormente relatados, obtendo-se maior confiabilidade sobre a real condição do lote avaliado.

Nas sementes de girassol a intensidade da dormência é dependente da variedade e das condições de ambiente que a planta ou a semente estiver exposta durante seu desenvolvimento (Marcos Filho et al., 1987; Rossi, 1998).

Em estudos preliminares sobre a inibição da dormência em sementes de girassol, França Neto et al. (1983) avaliaram a eficiência de pré-condicionamento das sementes antes da germinação (com solução de ethrel) e pré-esfriamento (em câmara fria a 10 °C com 50% UR), concluindo que o armazenamento das sementes em câmara fria foi o método mais fácil e prático, no qual a superação da dormência foi alcançada em 20 dias.

Marcos Filho et al. (1987) testaram diferentes métodos para superação de dormência em sementes de girassol, tais como pré-secagem, pré-resfriamento, tratamento das sementes com giberilina, aplicação de ethrel e nitrato de potássio no substrato papel, lavagem das sementes em água corrente, além do tempo necessário para superação natural da dormência com armazenamento das sementes em ambiente. Os autores concluíram que o uso de giberilina e ethrel é eficiente na superação da dormência das sementes, bem como o armazenamento por 60 dias após a colheita.

De acordo com as recomendações das Regras para Análise de Sementes (R.A.S.), os métodos para superação de dormência em sementes de girassol são: pré-esfriamento à temperatura de 5-10 °C, por até sete dias ou mais e pré-secagem sob temperatura de 30-35 °C por sete dias em estufa de circulação de ar (Brasil, 2009). Conforme verificaram Marcos Filho

et al. (1987), o tratamento com pré-esfriamento a 5 °C por sete dias foi mais eficiente em relação ao tratamento com pré-secagem a 40 °C durante cinco e 10 dias.

Bianco et al. (1994) observaram que embriões de girassol passaram a apresentar dormência na terceira semana após a antese, e após período de três dias de secagem as sementes apresentaram redução na concentração de ácido abscísico (ABA) e um pequeno aumento da germinação. Os autores concluíram que somente o armazenamento em ambiente seco por aproximadamente 40 dias (seis semanas) foi eficiente para a completa superação da dormência. Os autores também verificaram que a aplicação de giberilina aumentou a germinação apenas nas sementes que já haviam passado pelo tratamento de secagem. Porém a aplicação não foi capaz de ativar totalmente o metabolismo para que a germinação ocorresse completamente, concluindo que a predisposição para que as sementes de girassol germinem relaciona-se com a supressão da síntese de ABA no eixo embrionário.

2.3. Qualidade fisiológica da semente

Assim como em outras culturas, a qualidade fisiológica das sementes de girassol caracteriza-se como parte fundamental para o incremento da produção e produtividade da lavoura, pois quando as sementes são colhidas com alto potencial fisiológico e armazenadas adequadamente, têm grande probabilidade de sucesso em campo (Vieira, 2005).

Marcos Filho (2005) refere-se à semente como um dos principais insumos agrícolas, visto que é por meio dela que as características selecionadas no melhoramento genético podem ser reproduzidas no campo. Apenas com sementes de qualidade pode-se obter um adequado estabelecimento do estande, requisito básico para o sucesso do empreendimento agrícola.

Diante disto, as empresas produtoras de sementes têm uma especial atenção em garantir a qualidade de seu produto ao mercado consumidor, estando este cada vez mais exigente, buscando alta porcentagem de germinação e vigor nas sementes comercializadas (McDonald, 1998).

A legislação brasileira exige uma porcentagem mínima de germinação para que as sementes possam ser comercializadas. No caso do girassol, o requisito é de no mínimo 70% para sementes da categoria Básica e 75% para as demais categorias (Brasil, 2005).

O teste de germinação é o mais frequentemente utilizado na avaliação da viabilidade das sementes, sendo este conduzido sobre condições ótimas, com o objetivo de fornecer informações sobre o valor das sementes para uma futura semeadura, gerando subsídio para diferenciação da qualidade dos lotes de sementes. No entanto, a relação dos resultados de laboratório com as obtidas no campo pode ser insatisfatória, devido a condições ambientais não controladas em campo (Marcos Filho, 2005, Brasil, 2009).

Diante da dificuldade em relacionar o comportamento das sementes observado no teste de germinação com as reais condições de campo, surge o conceito de vigor da semente, que pode ser definido como o nível de energia que as sementes possuem para realizar a germinação (Carvalho, 1986). Assim, em laboratório, sob condições controladas, as sementes expressão seu potencial germinativo; no entanto, quando as condições ambientais não são controlados (campo), o desempenho (germinação) dependerá de seu vigor (energia) para superar as condições adversas do ambiente (ISTA, 1995).

Quando as sementes são expostas às condições de campo próximas da ideal, a emergência terá uma boa relação com a germinação (viabilidade) e o vigor; porém, isto nem sempre ocorre, uma vez que as sementes encontram-se sujeitas as diferentes condições de estresses, como temperaturas abaixo ou acima da ótima, baixa disponibilidade de água ou excesso hídrico, que podem interferir no seu comportamento. Neste caso, lotes de sementes com alto vigor deverão apresentar melhor desempenho do que os de vigor mais baixo, mesmo que o teste de germinação não tenha acusado diferenças entre os mesmos (ISTA, 1995).

Por outro lado, os testes de vigor não vêm substituir o de germinação, e sim complementá-lo, tornando-se uma ferramenta a mais para diferenciar lotes com germinação semelhante (Marcos Filho, 2005). O vigor reflete a manifestação de um conjunto de características que determinam o potencial das sementes para uma emergência rápida e uniforme de plântulas, o que impossibilita o desenvolvimento de um teste único que possa representar o potencial das sementes expostas a variadas situações de estresse (Marcos Filho, 1994; ISTA, 1995).

O teste de germinação, apesar de ser considerado um bom parâmetro para avaliação da viabilidade das sementes, necessita de um tempo considerável para a sua condução. No caso de sementes de girassol, este período é de até 10 dias (Brasil, 2009). Outro fator que interfere na avaliação é a dormência das sementes recém colhidas (Rossi, 1998; Marcos Filho et al.,

1987; Bianco et al., 1994), que dificulta a avaliação da viabilidade pelo teste de germinação, necessitando de tratamentos específicos de superação da dormência, prolongando ainda mais a duração do teste.

Dentro deste contexto, os testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica das sementes são importantes por demandarem um período de tempo geralmente curto na geração de resultados (Albuquerque et al., 2001). Conforme relataram Carvalho et al. (2009), métodos confiáveis, rápidos e de fácil execução fazem parte da atual necessidade das instituições de pesquisa, empresas e laboratórios de análise de sementes, principalmente por favorecer o descarte de lotes já na recepção ou no beneficiamento das mesmas. A avaliação rápida é importante para o monitoramento da qualidade das sementes nas diversas etapas de produção, permitindo a identificação do momento em que a perda do vigor pode estar ocorrendo, fornecendo assim subsídios para ajustes nas operações e, dessa forma, melhorar a qualidade dos lotes produzidos (ISTA, 1995).

Os testes de vigor podem ser classificados como testes físicos, fisiológicos, bioquímicos e de resistência a estresse (Marcos Filho, 2005). Dentro desta classificação, os testes que mais se destacam são: velocidade de germinação, emergência e crescimento de plântulas (testes fisiológicos); teste de frio e de envelhecimento acelerado (testes de resistência a estresse); teste de condutividade elétrica e de tetrazólio (testes bioquímicos).

Frente à demanda por testes rápidos para auxiliar a tomada de decisões durante o processo de produção e comercialização de sementes, o teste de tetrazólio tem sido o mais frequentemente utilizado. Sua metodologia está consolidada para diferentes espécies, como soja (França Neto et al., 1999); milho (Dias e Barros, 1999) e amendoim (Bittencourt e Vieira, 1999), além de não ser influenciado pela dormência presente nas sementes, tendo assim elevada aceitação e confiabilidade das empresas e profissionais da área de produção e tecnologia de sementes.

2.4. Teste de tetrazólio

Métodos rápidos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes tem sido alvo da pesquisa desde o final do século XIX, e fazem parte da atual demanda da indústria sementeira (Delouche, 1976; Carvalho et al., 2009).

O TZ é um teste bioquímico, fundamentado na atividade das enzimas desidrogenases, as quais são responsáveis por catalisar as reações respiratórias nas mitocôndrias, durante a glicólise e o ciclo de Krebs (França Neto, 1999). A solução 2, 3, 5 trifenil cloreto ou brometo de tetrazólio é uma solução incolor que em contato com as sementes, espalha-se pelos tecidos, e se junta aos íons de hidrogênio (H^+) liberados no processo respiratório das células. Essa hidrogenação da solução de tetrazólio é catalisada pela enzima desidrogenase do ácido málico produzindo o trifenil formazam, composto vermelho e não difusível, indicando assim atividade respiratória no tecido, o que possibilita a identificação de tecidos vivos (que apresentam coloração vermelha) e de mortos (que permanecem sem coloração) (Costa, et al., 2007; ISTA 2007; Brasil, 2009; Deminiciis et al., 2009).

Para que a solução de tetrazólio entre em contato com os tecidos das sementes, permitindo a avaliação da sua qualidade fisiológica, uma série de determinações específicas são necessárias para cada espécie de interesse, visto que as sementes possuem características diferentes, principalmente quanto à permeabilidade do tegumento. Estas determinações são em relação ao pré-condicionamento das sementes, visando à hidratação e conseqüente reativação das atividades enzimáticas, bem como a penetração da solução nos tecidos (Deminiciis et al., 2009); determinação da concentração da solução, da temperatura e o tempo de condicionamento, e a interpretação correta da coloração obtida nas sementes (Oliveira et al., 2005).

Conforme ressaltou Marcos Filho (2005), o teste de tetrazólio atualmente encontra-se como um dos testes mais completos e eficientes, principalmente por obter rápido diagnóstico sobre a qualidade fisiológica (aproximadamente 24 horas). Dentre as vantagens citadas para o teste, está a confiabilidade dos resultados pela avaliação individual das sementes, identificando danos físicos e fisiológicos; a classificação de diferentes níveis de viabilidade e vigor; e a utilização de equipamentos simples e baratos (França Neto et al., 1998).

O “Topographical Tetrazolium Test”, como é denominado pela International Rules for Seed Testing (ISTA), é um teste utilizado para rápida determinação do potencial de germinação, quando há necessidade de uma semeadura imediata. É indicado, também para espécies que apresentam germinação lenta e quando as sementes apresentam dormência (ISTA, 2008).

A característica de não interferência da dormência das sementes na avaliação da qualidade fisiológica pelo TZ é destacada como vantagem por diferentes autores, uma vez que a dormência é o principal entrave da realização do teste de germinação (França Neto et al., 1998; ISTA 2008; Dias e Alves, 2008a; Brasil, 2009).

No Brasil, o teste de tetrazólio tem sido intensamente estudado e sua metodologia aprimorada para avaliação da viabilidade; no entanto, poucos trabalhos são conduzidos para estabelecer categorias de vigor das sementes, tendo destaque para algumas culturas como milho, soja, feijão, algodão e amendoim (França Neto, 1999; Marcos Filho, 2005). No caso do girassol há carência de estudos sobre o teste avaliando o vigor das sementes.

O teste de tetrazólio para avaliação de sementes de soja destaca-se como o mais estudado, contando com manuais específicos para sua condução, determinando não só viabilidade, mas também o vigor. De acordo com França Neto (1999), o TZ tem se destacado na avaliação da qualidade fisiológica das sementes de soja, visto que este se caracteriza por ser rápido e preciso na avaliação da viabilidade e vigor das sementes, além de fornecer subsídios para identificação das possíveis causas que provocam danos às mesmas. Conforme ressaltou Costa et al. (2007), o teste permite a identificação dos principais danos causadores da perda da qualidade das sementes de soja, tais como dano mecânicos, danos por percevejo e deterioração por umidade.

Assim como para a soja (França Neto et al., 1999; Costa e Marcos Filho, 1994), outras culturas contam com metodologias já determinadas para realização do teste de tetrazólio com separação de classes de vigor, destacando-se milho (Dias e Barros, 1999), amendoim (Bittencourt e Vieira, 1999), algodão (Vieira e Von Pinho, 1999) e feijão (Bhering et al., 1999). O que difere uma metodologia da outra, normalmente são tempo e forma de hidratação, tempo de imersão das sementes e concentração da solução de tetrazólio, retirada ou não do tegumento e/ou pericarpo, se há necessidade ou não de corte das sementes, entre outros detalhes específicos para cada espécie.

Trabalhos abordando a determinação da viabilidade pelo teste de tetrazólio são frequentemente realizados. Assim, encontram-se na literatura estudos com canafistula (Oliveira et al., 2005); milho (Chamma e Novembre, 2007); *Panicum maximum* (Dias e Alves, 2008a); *Brachiaria brizantha* (Dias e Alves, 2008b); pinhão manso (Pinto et al., 2009); cunhã (Deminicis et al., 2009); aveia preta (Souza et al., 2009); aveia branca (Souza et al., 2010a); triticale (Souza et al., 2010b); leucena (Costa e Santos, 2010), café (Clemente et al., 2011), dentre outros.

Bhering et al. (2005) estudaram o teste de tetrazólio para sementes de melancia e separaram cinco classes de viabilidade, sendo as duas primeiras classes consideradas sementes vigorosas. Também, Barros et al. (2005) classificaram as sementes de abobrinha em cinco classes distintas, diferenciando-as quanto ao vigor. Já Lima et al. (2010), apesar de

trabalharem com espécie da mesma família, separaram as sementes de pepino em três classes: sementes vigorosas, viáveis não vigorosas, e não viáveis.

Também objetivando separar as sementes em classes de vigor por meio do teste de tetrazólio, Santos et al. (2007) classificaram as sementes de tomate em três categorias e observaram que a hidratação das sementes entre papel por três horas, a 45 °C, foi suficiente para que alcançassem 45,0 % de água, o que proporcionou coloração adequada para avaliação das sementes.

Gaspar-Oliveira et al. (2010) estudaram metodologia do tetrazólio para avaliação de sementes de mamoneira e concluíram que o teste é eficiente para avaliação da viabilidade e promissor na avaliação do vigor.

Ribeiro et al. (2010) avaliaram a metodologia do TZ na determinação do potencial fisiológico de sementes de macaúba. Para tanto, o embrião foi excisado e imerso diretamente na solução de tetrazólio, e com apenas quatro horas foi possível se obter 10 padrões de coloração e separar as sementes em três classes de vigor.

Com relação ao estudo do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade do girassol, poucos trabalhos podem ser listados. Alguns pesquisadores têm utilizado as recomendações das Regras para Análise de Sementes – R.A.S. (Brasil, 2009) apenas para complementação da metodologia de avaliação da qualidade fisiológica das sementes, e não com intuito de aprimorar o método. Neste sentido, Vieira (2005) relatou que a metodologia recomendada nas R.A.S. pode não ser a mais adequada na avaliação das sementes para a espécie, sugerindo que as indicações sejam ajustadas.

Murcia et al. (2002) ao estudarem o comportamento de sementes de girassol com alto teor de ácido oléico sob baixa temperatura, conduziram o teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade das sementes, usando-se hidratação a 10 °C por 16 horas, e coloração por imersão na solução de 0,5% por duas horas a 30 °C, e em 24 horas a 10 °C. Os autores observaram menor intensidade na coloração dos tecidos quando as sementes ficaram imersas na solução à baixa temperatura. Esses resultados foram atribuídos à redução da respiração dos tecidos quando expostos a esta condição.

Dentre as recomendações existentes, tanto nas regras nacionais (Brasil, 2009) quanto nas internacionais (ISTA, 2003), observa-se que a abordagem é direcionada apenas para avaliação da viabilidade, sendo apresentadas diferentes propostas de metodologia.

Conforme recomendações da International Seed Testing Association (ISTA, 2003), o preparo das sementes de girassol consiste na hidratação por imersão direta em água por 18

horas sob a temperatura de 20 °C, retirada do pericarpo e tegumento interno, e imersão das sementes na solução de tetrazólio na concentração de 1% por três horas, a 30 °C.

Nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), além da recomendação acima citada, constam outras duas: uma para sementes com menor teor de óleo e outra para aquelas com teor de óleo mais elevado. De acordo com o observado nas R.A.S., há grande variação entre as recomendações, principalmente quanto ao pré-umedecimento das sementes, que segundo Brasil (2009) pode ser entre papel ou imersão direta em água.

Nas recomendações das R.A.S., verifica-se variação no período de hidratação das sementes, que pode ser entre substrato papel umedecido no intervalo de 15 a 30 horas, sob uma mesma temperatura (25 °C). Outra questão a ser levantada é quanto à concentração da solução, pois recomenda-se imersão das sementes em solução de tetrazólio na concentração de 0,5% de 30 minutos a uma hora, ou ainda 1% por três horas, sendo ambas as recomendações sob a mesma temperatura de 30 °C (Brasil, 2009).

3. CAPITULO I - VIABILIDADE DE SEMENTES DE GIRASSOL AVALIADA PELO TESTE DE TETRAZÓLIO

TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GIRASSOL

RESUMO - O girassol pode apresentar elevado grau de dormência em sementes recém-colhidas, o que dificulta a avaliação do poder germinativo das mesmas. O teste de tetrazólio (TZ) caracteriza-se como uma alternativa promissora para avaliação da viabilidade das sementes, por ser um método rápido e não influenciado pela dormência. O presente trabalho objetivou estudar diferentes procedimentos do teste de tetrazólio para análise da viabilidade de sementes de girassol. Foram selecionados quatro lotes de sementes, os quais foram avaliados quanto ao grau de umidade, germinação e emergência de plântulas em campo. Para o estudo do TZ-viabilidade testou-se: melhor procedimento para extração do pericarpo e tegumento; hidratação por imersão direta em água por 16 e 18 h, a 25 °C; a coloração em solução de tetrazólio nas concentrações de 0,1 e 0,5%, durante duas, três e quatro horas e concentração de 1,0% durante uma, duas e três horas, sob a temperatura de 30 °C. Foi proposta a separação das sementes em três classes: viáveis, não viáveis e mortas, sendo descritos os critérios utilizados para cada classificação. Os resultados obtidos indicaram que a avaliação do TZ-viabilidade em sementes de girassol pode ser realizada com hidratação das sementes por imersão em água, durante 16 h, a 25 °C; retirada do pericarpo e tegumento com corte longitudinal entre os cotilédones de até 1/3 do comprimento do aquênio, e coloração por imersão em solução de tetrazólio a 0,1%, por 3 h, a 30 °C.

Termo para indexação: *Helianthus annuus* L.; qualidade fisiológica e dormência.

SUNFLOWER SEED VIABILITY ASSESSED BY THE TETRAZOLIUM TEST

ABSTRACT- Sunflower can present a high degree of dormancy in freshly harvested seeds. This fact may difficult the assessment of seed germination after harvesting. The tetrazolium test (TZ) is characterized as a promising alternative for assessing the viability of the seeds, being fast and not affected by dormancy. Thus, this study investigated different procedures of the tetrazolium test for assessing the viability of sunflower seeds. Four lots of sunflower seeds were used, which were evaluated for moisture content, germination and seedling field emergence. For the TZ-viability study, some procedures were evaluated: best procedure for extraction of the pericarp and seed coat; hydration by immersion in water for 16 and 18 h at 25 ° C, staining in tetrazolium solution at concentrations of 0.1% and 0.5% for two, three and four hours and concentration of 1% during one, two and three hours, at temperature of 30 °C. Seeds were ranked into there classes of viability: viable, non-viable and dead, and the criteria for each classification was described. The results indicated that the assessment of viability in TZ-sunflower seeds can be performed with the seed hydrated by immersion for 16 h at 25 °C, removal of the pericarp and the seed coat by cross sectioning between the cotyledons up to 1/3 the length of the achene; staining by immersion in a 0.1% tetrazolium solution for 3 h at 30 °C.

Index terms: *Helianthus annuus* L.; physiological seed quality and dormancy.

3.1. INTRODUÇÃO

A qualidade fisiológica de sementes de girassol, assim como de outras culturas, caracteriza-se como parte fundamental para o incremento da produção e produtividade de uma lavoura. Por meio da semente as características selecionadas no melhoramento genético são reproduzidas no campo e o adequado estabelecimento do estande é obtido (Marcos Filho, 2005; Vieira, 2005).

O teste de germinação é o mais utilizado para determinar a viabilidade de sementes. Entretanto, apresenta limitações para algumas espécies, como o período elevado para obtenção da porcentagem máxima de germinação, divergência dos resultados obtidos em laboratório e em campo, e a impossibilidade de avaliação de sementes dormentes (Marcos Filho, 2005; Brasil, 2009; Souza et al., 2010a).

Para o teste de germinação de sementes de girassol, é necessário um período de até 10 dias, como as sementes recém-colhidas normalmente apresentam dormência, este período pode se estender em 17 dias ou mais, em razão da necessidade de se utilizar tratamentos específicos para promoção da germinação (França Neto et al., 1983; Marcos Filho et al., 1987; Bianco et al., 1994; Rossi, 1998; Brasil, 2009).

A rapidez na obtenção de resultados sobre a qualidade fisiológica de um lote de sementes é uma demanda presente em todas as etapas de produção. Contudo, esse aspecto é de fundamental importância para a rápida decisão sobre o destino dos lotes (ISTA, 1995; Albuquerque et al., 2001; Carvalho et al., 2009; Souza et al., 2010b). O tempo e os recursos investidos no beneficiamento das sementes podem não ser bem empregados quando não se conhece com precisão o potencial fisiológico destas. Assim, a dormência presente nas sementes recém-colhidas de girassol pode ser um problema, uma vez que a análise imediata da viabilidade pelo teste de germinação é comprometida, fazendo-se necessário o armazenamento das sementes por um período de no mínimo 40 dias para superação do impedimento germinativo das sementes (Marcos Filho et al., 1987; Bianco et al., 1994).

Visando superar essa séria limitação, destaca-se o teste de tetrazólio, pela sua rapidez (viabilidade estimada em menos de 24 horas), confiabilidade (análise individual de cada semente) e pelo fato de não ser influenciado pela dormência da semente (Marcos Filho, 2005). Por essas vantagens, o teste de tetrazólio tem sido incluído cada vez mais em programas de

controle de qualidade interno de empresas produtoras de sementes, especialmente para avaliação de espécies que já possuem metodologias consistentes, como a soja (França Neto et al., 1999) e milho (Dias e Barros, 1999).

O teste de tetrazólio é um teste bioquímico, fundamentado na atividade das enzimas desidrogenases, que são responsáveis por catalisar as reações respiratórias nas células. A hidrogenação da solução de tetrazólio (2-3-5 trifenil cloreto de tetrazólio) produz um composto vermelho (trifenil formazam), indicando atividade respiratória nos tecidos viáveis (vivos), ao passo que a não coloração dos tecidos (branco) indica a presença de tecidos mortos. Quando a coloração for intensa, há indicação de tecidos em deterioração (França Neto, 1999; Costa et al., 2007; ISTA, 2008; Brasil, 2009; Deminiciis et al., 2009).

Conforme destacaram Bhering et al. (2005), a eficácia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica das sementes depende de adequação da metodologia para cada espécie. Enfocando o estudo do método, encontram-se na literatura vários trabalhos, podendo ser citadas mais recentemente as pesquisas com *Panicum maximum* (Dias e Alves, 2008), pinhão manso (Pinto et al., 2009), aveia branca (Souza et al., 2010b) e café (Clemente et al., 2011).

Para sementes de girassol, há recomendações nas Regras para Análise de Sementes – R.A.S. (Brasil, 2009) que abrange indicações diferentes, uma por Lisakowski (1981) e outra pela ISTA (2008), acarretando assim amplitude de recomendações, o que dificulta a padronização das avaliações entre laboratórios. Esta variação é verificada quanto ao pré-condicionamento das sementes, realizada entre papel ou por imersão direta em água; ao tempo de exposição das sementes à solução de tetrazólio (0,5 a 3 horas), bem como a concentração da solução (0,5 e 1%) o que gera dificuldade na escolha do melhor método para a condução do teste.

Baseado no exposto verifica-se que a metodologia para a condução do teste de tetrazólio em sementes de girassol ainda não está uniformizada. Em razão da importância da cultura e do problema da dormência de sementes recém-colhidas, o presente trabalho objetivou identificar dentre os procedimentos recomendados àquele que permite de forma mais rápida e precisa a avaliação da viabilidade de sementes de girassol pelo teste de tetrazólio, bem como estudar a possibilidade de redução da concentração da solução utilizada na análise.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba-PR e Embrapa Soja, em Londrina-PR, durante o período de setembro de 2010 a julho de 2011.

Foram utilizadas sementes (aquênios) de girassol da cultivar BRS 122, produzidas na safra 2010/2011. As amostras de sementes foram homogeneizadas em divisor centrífugo (Brasil, 2009), divididas igualmente em quatro subamostras e armazenadas em sacos de papel, tipo Kraft, em ambiente controlado ($16^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 55% - 60% de UR), durante todo período experimental.

Foi avaliada inicialmente a qualidade de 12 lotes de sementes de girassol, sendo posteriormente selecionados quatro lotes com potenciais fisiológicos distintos, os quais foram submetidos às seguintes determinações:

- **Grau de umidade:** realizado pelo método de estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, com duas subamostras de cinco gramas de sementes por lote. Os resultados foram expressos em porcentagem, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes – R.A.S. (Brasil, 2009).

- **Germinação:** avaliada após armazenamento das sementes por quatro meses sob temperatura de $16^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 55% de umidade relativa do ar, visando a completa superação da dormência. Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, subdivididas em duas subamostras de 25, totalizando 200 sementes por lote. As sementes foram distribuídas em rolo de papel toalha umedecido com água, na quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. O teste de germinação foi conduzido em germinador, tipo Mangelsdorf, sob temperatura de 25°C . A avaliação foi realizada no sétimo dia após a semeadura e os resultados foram expressos em porcentagem média de plântulas normais (Brasil, 2009).

- **Emergência de plântulas em campo:** antes da semeadura em campo, foi necessário realizar tratamento para superação da dormência, armazenando as sementes recém colhidas em câmara fria, sob temperatura de 10°C e 50% de UR, durante 20 dias (França Neto et al., 1983). Após este período, quatro repetições de 50 sementes foram distribuídas em linhas de 2,5 m de comprimento a uma profundidade de 3-5 cm, e espaçadas entre si por 0,5 m. A avaliação ocorreu 21 dias após a semeadura (Albuquerque et al., 2001) e os resultados foram expressos em porcentagem média das plântulas emergidas.

- **Teste de tetrazólio:** foram realizadas análises preliminares com o objetivo de determinar a forma mais adequada de hidratação e do corte dos aquênios para facilitar a extração do pericarpo e do tegumento, minimizando danos aos cotilédones. Neste sentido, testou-se a hidratação entre papel (EP) e por imersão direta em água (IA) por 16 h, a 25 °C (Concenço et al., 2007; Brasil, 2009); e três diferentes tipos de cortes: a) corte longitudinal entre os cotilédones; b) corte transversal aos cotilédones, ambos realizados na porção superior, região distal ao eixo embrionário, em profundidade de até 1/3 do comprimento total do aquênio; c) corte lateral em toda a extensão do aquênio.

Com base nos procedimentos preliminares identificou-se o melhor método de preparo das sementes, que por sua vez foi adotado na condução do estudo do teste de tetrazólio (Figura 1A).

A hidratação das sementes foi realizada com imersão direta dos aquênios em 100 mL de água, por períodos de 16 e 18 h, mantidos sob temperatura de 25 °C em germinador do tipo Mangelsdorf (Concenço et al., 2007; ISTA, 2008; Brasil, 2009). Após cada período de hidratação, determinou-se o grau de umidade das sementes pelo método da estufa, conforme descrito anteriormente.

Para a coloração, os embriões foram imersos em 10 mL de solução de tetrazólio, nas seguintes concentrações: 0,1% e 0,5%, durante 2, 3 e 4 h; 1,0% durante 1, 2 e 3 h mantidos no escuro, a 30 °C (Brasil, 2009).

Após cada período de coloração, as sementes foram retiradas da solução, lavadas em água corrente e mantidas submersas em água até o momento da avaliação, sendo, então, seccionadas longitudinalmente entre os cotilédones, com o auxílio de lâmina de aço inox, obtendo-se duas metades do embrião e expondo os tecidos internos.

A avaliação foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, observando os tecidos externos e internos de ambas as metades do embrião quanto à localização, extensão e intensidade da coloração, dando ênfase às áreas vitais das sementes (Figura 1B). Os tecidos que apresentaram coloração vermelho carmim normal foram considerados viáveis; os que permaneceram com a cor vermelho carmim intenso, foram considerados tecidos em deterioração, e aqueles sem coloração (branco), com aspecto leitoso (flácido), foram considerados mortos (Delouche et al., 1976; França Neto et al., 1999; ISTA, 2003; Brasil, 2009). Com base nessa avaliação, foi proposta a separação das sementes em três classes: Classe 1 – sementes viáveis, Classe 2 – sementes não viáveis e Classe 3 – sementes mortas.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, e os resultados submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$) e comparação das médias dos testes de germinação, emergência em campo e tetrazólio pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando o programa estatístico ASSISTAT, versão 7.6 beta (Silva, 2011). Foi realizada correlação de Spearman entre o teste de germinação e o melhor procedimento identificado pelo teste de tetrazólio, utilizando o programa estatístico Mstat 5.4.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com as avaliações preliminares identificou-se maior facilidade no preparo das sementes, para retirada do pericarpo e tegumento, quando a hidratação foi realizada por imersão direta em água e o corte efetuado longitudinalmente entre os cotilédones, na região distal ao eixo embrionário, com profundidade de até 1/3 do comprimento do aquênio (Figura 1A).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados do teste de umidade onde foi observado que os lotes estavam uniformes quanto ao grau de umidade inicial, com variação de apenas 0,4 pontos percentuais, o que confere consistência aos resultados obtidos nas demais avaliações (Marcos Filho, 1999). Verificou-se, também, que o grau de umidade final, após a hidratação das sementes por imersão, ficou entre 51,0% e 53,7% para 16 h de condicionamento, e de 51,0% a 54,6% após 18 h. A diferença máxima de absorção de água pelas sementes, entre os períodos de 16 e 18 h foi de apenas 1,6% para o lote 1, demonstrando que o pré-condicionamento das sementes de girassol pode ser realizado em 16 horas sob a temperatura de 25 °C. Esses valores estão de acordo com Concenço et al. (2007), os quais observaram estabilização na absorção de água pelas sementes de girassol após 16 h de condicionamento. A maioria das sementes com reservas cotiledonares, como é o caso do girassol, atinge graus de umidade superiores a 45% na Fase I do modelo trifásico de hidratação da semente (Bewley e Black, 1983; Marcos Filho, 2005).

Pelo teste de germinação (Tabela 1), os lotes 1 e 2 foram classificados como de maior qualidade fisiológica, enquanto que os lotes 3 e 4 apresentaram-se como os de menor qualidade. Estes resultados foram confirmados pela emergência de plântulas em campo, que revelou superioridade dos lotes 1 e 2 em relação aos lotes 3 e 4 (Tabela 1). As avaliações

iniciais foram importantes para identificar os lotes com maior e menor potencial, a fim de verificar a confiabilidade do teste de tetrazólio para distinção dos mesmos (Deminicis et al., 2009). Assim, com os resultados obtidos nas avaliações iniciais observou-se maior viabilidade dos lotes 1 e 2, em relação aos lotes 3 e 4.

Para a distinção das classes de viabilidade do teste de tetrazólio foram considerados os seguintes critérios:

-Classe 1 – sementes viáveis (Figura 2 A): tecidos firmes com coloração uniforme (vermelho carmim) em toda a extensão do embrião (1), ou quando apresentaram danos não significativos para a germinação e estabelecimento de plântulas normais (2 - 8). Assim, danos tolerados foram aqueles presentes na região vascular central em um dos cotilédones (2), ou em ambos (3), desde que não tenha atingido a região de união entre os cotilédones e o eixo embrionário; danos com área menor que a metade dos cotilédones (região sem colorir) (4); região sem colorir (5) ou vermelho intenso com extensão de até metade da extremidade das plúmulas (6); danos na região do hipocótilo-radícula (7), desde que estes tenham atingido uma extensão inferior a metade do cilindro central, e danos de até 1/3 da extremidade da radícula (8), desde que estes não ultrapassassem a região do cilindro central.

- Classe 2 – sementes não viáveis (Figura 2 B): danos superiores a metade da área total dos cotilédones (9), ou quando estes atingiram a região de união dos cotilédones ao eixo embrionário; danos superiores a metade nas plúmulas (10); danos na região do cilindro central (11), e danos que atingiram mais de 1/3 da extremidade da radícula (12).

-Classe 3 – sementes mortas (Figura 2 C): sementes que não apresentaram coloração em toda a extensão do embrião (13), com tecidos flácidos (de aspecto mole) (14), ou ainda com regiões escuras apresentando adiantado estágio de deterioração (15 e 16).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da condução do teste de tetrazólio com hidratação das sementes por 16 e 18 h, expondo os embriões por duas, três e quatro horas à solução de 0,1% e a 30 °C. Nesta concentração da solução, para o período de duas horas, não houve possibilidade de separação dos lotes em comparação com os resultados obtidos nos testes de germinação e de emergência em campo (Tabela 1). A baixa concentração da solução, aliada ao curto período de exposição das sementes, pode ter influenciado a menor precisão para distinção da coloração dos tecidos, principalmente na região das plúmulas, em que a coloração geralmente se apresentou menos intensa, dificultando a definição de tecidos vivos (colorido) e de tecidos mortos (branco). Souza et al. (2010a) relataram dificuldades para avaliar as estruturas essenciais das sementes de tritcale quando utilizaram solução na

concentração de 0,1%. No presente trabalho, ao analisar o tratamento com exposição por três horas à solução de 0,1%, observou-se que o teste foi sensível para separação dos lotes, classificando-os de forma semelhante aos demais testes (Tabela 1), principalmente revelando os lotes de menor potencial fisiológico (lotes 3 e 4). O mesmo não se verificou para os períodos de duas e quatro horas de coloração.

Na hidratação por 18 horas (Tabela 2), não foi possível obter separação eficiente dos lotes. Apesar do período de três horas ter identificado o lote 3 como de baixa viabilidade, este não se distinguiu do lote 1, considerado como de qualidade superior (Tabela 1).

Assim, os resultados com a comparação de médias revelaram que a exposição dos embriões por três horas na solução de tetrazólio a 0,1% foi promissora para a distinção dos lotes de maior e de menor potencial fisiológico.

Metodologias eficientes com utilização de solução de tetrazólio em concentrações reduzidas são importantes para otimizar a aplicação dos recursos dentro do laboratório. Outras recomendações para condução do teste de tetrazólio utilizando solução de baixa concentração já foram feitas para outras espécies como algodão (Vieira e Von Pinho, 1999) e canafistula (Oliveira et al., 2005) na concentração de 0,1%; feijão (Bhering et al., 1999) e soja (França Neto et al., 1999) na concentração de 0,075%.

Na Tabela 3 encontram-se os valores obtidos com a solução de 0,5%. Apesar de ser uma das concentrações recomendadas nas R. A. S. (Brasil, 2009), a mesma não demonstrou eficiência para distinção da viabilidade dos lotes estudados. Com a hidratação por 16 h, independentemente do período de coloração, não foram detectadas diferenças entre a viabilidade dos lotes. A hidratação por 18 h, tanto para duas horas quanto para quatro horas de coloração, apresentou diferença estatística, porém a classificação dos lotes não foi semelhante à obtida pelos testes de germinação e emergência em campo (Tabela 1), visto que os lotes 1 e 4 apresentaram-se estatisticamente iguais.

A avaliação das sementes imersas na concentração de 1,0% (Tabela 4) exigiu maior cuidado, uma vez que, independente do período de exposição à solução, a coloração foi intensa, o que dificultou a distinção dos tecidos viáveis daqueles em deterioração. França Neto et al. (1998), para sementes de soja, sugerem que o uso de soluções mais concentradas de tetrazólio como 0,5% a 1,0%, impossibilita a identificação de danos mecânicos recentes ocorridos nas sementes. No caso do girassol, a região mais crítica para ser avaliada foi a do eixo embrionário, especialmente na extremidade da radícula, em razão da forte coloração, provavelmente influenciada pela maior atividade respiratória no local. Assim, foi necessário

realizar diversos cortes para identificar a extensão e profundidade da coloração dos tecidos, tornando a avaliação mais demorada e, consequentemente, exaustiva para o analista.

Os resultados demonstraram que na hidratação por 16 horas, tanto a coloração por uma hora quanto por três horas, não permitiu diferenciar os lotes. Na coloração por duas horas foi possível a separação dos lotes de menor potencial fisiológico, de forma semelhante às avaliações de germinação e emergência em campo (Tabela 1). O tratamento com a hidratação das sementes por 18 h e coloração por 3 h, está entre as metodologias indicadas pela ISTA (2003) e por Brasil (2009) para sementes de girassol; no entanto, a classificação da viabilidade por este método (Tabela 4) não foi coerente com a obtida pelos testes de germinação e emergência em campo, pois o lote de maior qualidade (lote 1) não se diferenciou do lote de menor qualidade (lote 4).

A correlação de Spearman entre o teste de germinação e o teste de tetrazólio, para aqueles tratamentos que apresentaram ranqueamento dos lotes semelhantes pelo teste de médias, não apresentou significância estatística. O coeficiente de correlação (ρ) para o tratamento que utilizou coloração na solução a 0,1% por três horas (Tabela 2) foi de $\rho = 0,6$; já aquele em que a coloração se deu na concentração de 1% por duas horas (Tabela 4) foi de $\rho = 0,3$, sendo ambos hidratados por 16 horas.

Nas recomendações das R.A.S. (Brasil, 2009) e da ISTA (ISTA, 2008) encontra-se a indicação de hidratação das sementes por 18 h e coloração por 3 h, com concentração de 1%. Entretanto, no presente trabalho tal indicação não foi confirmada, pois o melhor resultado obtido para esta concentração foi com a hidratação de 16 h, aliada à coloração por 2 h de imersão na solução de tetrazólio. Vieira (2005) também verificou que a metodologia recomendada nas R.A.S. poderia não ser a mais adequada para avaliação de sementes de girassol, sugerindo ajustes.

Normalmente, a absorção de água para reativação das atividades metabólicas das sementes ocorre entre oito e 16 horas de embebição (Marcos Filho, 2005). Com os resultados obtidos, pode-se verificar que a hidratação das sementes de girassol por 16 horas foi suficiente para que as atividades metabólicas do embrião fossem restabelecidas, visto que permitiu a coloração adequada dos tecidos quando em contato com a solução de tetrazólio.

Considerando os resultados obtidos pelo teste de médias, e as dificuldades evidenciadas para avaliação das sementes quando expostas a concentração elevada (1%), o uso da solução de 0,1%, concentração inferior às recomendadas nas Regras para Análise de

Sementes (Brasil, 2009), demonstrou ser mais adequada para determinação da viabilidade das sementes de girassol.

3.4. CONCLUSÃO

A avaliação da viabilidade das sementes de girassol por meio do teste de tetrazólio é eficiente empregando-se:

- hidratação das sementes por imersão direta em água por 16 horas a 25 °C;
- retirada do pericarpo e tegumento por meio de corte longitudinal entre os cotilédones na região distal ao eixo embrionário, em profundidade de até 1/3 do comprimento total do aquênio;
- coloração dos embriões por imersão em solução de tetrazólio a 0,1%, por três horas, a 30 °C.

3.5. AGRADECIMENTOS

A Embrapa – Soja pelo apoio e concessão das sementes utilizadas no trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

3.6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.C.F.E.; MORO, F.V.; FAGIOLI, M.; RIBEIRO, M.C. Teste de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p.1-8, 2001.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination**. New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. v. 1.1983. 306p.

BHERING, M.C.; DIAS, D.C.F.S.; BARROS, D.I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica das sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, v.27, n.1, p.176-182, 2005. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v27n1/25196.pdf>.

BHERING, M.C.; SILVA, R.F.; ALVARENGA, E.M.; DIAS, D.C.F.S. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

BIANCO, J.; GARELLO, G.; LE PAGE-DEGIVRY, M.T. Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. **Seed Science Research**, v.4, n.2, p.57-62, 1994. <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=1352784&fulltextType=RA&fileId=S0960258500002026>.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

CARVALHO, L.F. SEDIYAMA, C.S.; REIS, M.S.; DIAS, D.C.F.; MOREIRA, M.A. Influência da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.09-17, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n1/a01v31n1.pdf>.

CLEMENTE, A.C.S.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARÃES, R.M.; ZEVIANI, W. M. Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.38-44, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v33n1/04.pdf>.

CONCENÇO, G.; COMIOTTO, A.; MORAIS, D.M.; LOPES, N.F.; FERREIRA, L.B.O. Sulfetrazone e qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.109-113, 2007.

<http://www.ufpel.edu.br/faem/agrociencia/v13n1/artigo17.pdf>.

COSTA, N.P.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja – Série Sementes. **Circular Técnica 39**. Embrapa. Londrina-PR, 2007, 8 p.

http://www.cnpso.embrapa.br/download/pdf/cirtec39_sementes.pdf.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Tradução de Flávio Rocha. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103 p.

DEMINICIS, B.B.; VIEIRA, H.D.; SILVA, R.F. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Clitorea ternatea* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.54-62, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n2/v31n2a06.pdf>.

DIAS, M.C.L.L.; ALVES, S.J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.152-158, 2008. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v30n3/20.pdf>.

DIAS, M.C.L.L.; BARROS, A.S.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de milho. In. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

FRANÇA NETO, J.B. Testes de tetrazólio para determinação do vigor das sementes. In. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1998. 72p. (EMBRAPA-CNPSO, Documentos, I 16).

FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C.; COSTA, N.P. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de soja. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

FRANÇA NETO, J.B.; POLA, J.N.; PALUDZYSZYN FILHO, E.; COSTA, N.P.; DIAS, M.C.L.L.; PEREIRA, L.A.G.; HENNING, A.A.; BORDIN, A.P.A. **Estudo preliminar sobre a inibição da dormência em sementes de girassol**. Congresso Brasileiro de Sementes, Campinas-SP, Resumo de trabalhos técnicos. Brasília, ABRATES, 1983. 189 p.

ISTA - International Seed Testing Association. Understanding seed vigour. Prepared by ISTA Vigour Test Committee, 1995. Disponível em:
<http://www.seedtest.org/upload/prj/product/UnderstandingSeedVigourPamphlet.pdf>.

ISTA - International Seed Testing Association. **Working Sheets on Tetrazolium Testing**. Bassersdorf: ISTA, v.1, 2003.

ISTA – International Seed Testing Association. Biochemical test for viability: the topographical tetrazolium test. In: **Chapter 6: International rules for seed testing**. Ed. 2008. Bassersdorf, 2008. p.6.1-6-30.

LISAKOWSKI, D. **Tetrazolium evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed**. Mississippi: Mississippi State University, 1981. 74p. (Dissertação de Mestrado).

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARCOS FILHO, J.; KOMATSU, Y.H.; BARZAGHI, L. Métodos para superação a dormências de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.9, n. 2, p. 65-74, 1987.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Teste de tetrazólio para avaliação das sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert – Leguminosae Caesalpinioideae. **Cerne**, v.11, n.2, p.159-166, 2005.

http://www.dcf.ufla.br/cerne/artigos/11-02-20097975v11_n2_artigo%2006.pdf.

PINTO, T.L.F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V.A.; CARVALHO, C.; GOMES, F.G.J. Avaliação da viabilidade das sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios x. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.195-201, 2009.

<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v31n2/v31n2a23.pdf>.

ROSSI, R.O. **Girassol**. Curitiba: R.O. Rossi, 1998. 333p.

SILVA, F.A.S. **Sistema de Assistência Estatística – ASSISTAT versão 7.6 beta**. Departamento de Engenharia Agrícola (DEAG) do CTRN da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – PB, 2011. <http://www.assistat.com/>.

SOUZA, C.R.; OHLSON, O. de C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia branca pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.174-180, 2010a. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n4/20.pdf>.

SOUZA, C.R.; OHLSON, O. de C.; GAVAZZA, M.I.A.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3, p.163-169, 2010b. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n3/v32n3a18.pdf>.

VIEIRA, O.V. **Ponto de maturação ideal para colheita do girassol visando alta qualidade da semente**. Curitiba, 2005. 79 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/3460>.

VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E.V.R. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In. KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.



Figura 1: A) sequência do corte e retirada do pericarpo e tegumento com a exposição do embrião; B) corte longitudinal entre os cotilédones e exposição da face interna dos cotilédones, e eixo embrionário (aumento de 1,6x no microscópio estereoscópico), com ênfase nas regiões vitais do embrião, sendo (v) região vascular central em um dos cotilédones, (p) plúmulas seccionada ao meio, (c) cilindro central e (e) eixo hipocótilo-radícula.

Tabela 1: Resultados do grau de umidade inicial (UI) e final (UF) após 16 e 18 horas a 25 °C, teste de germinação (G), e emergência de plântulas em campo (EC) dos lotes de sementes de girassol da cultivar BRS 122.

Lotes	UI	UF (16 h)	UF (18 h)	G	EC
	-----%-----				
1	8,4	51,0	52,6	94 a	83 a
2	8,6	51,3	51,0	92 ab	88 a
3	8,2	53,7	54,6	87 bc	71 b
4	8,4	52,3	52,2	84 c	73 b
CV (%)	--	--	--	3,39	6,22

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

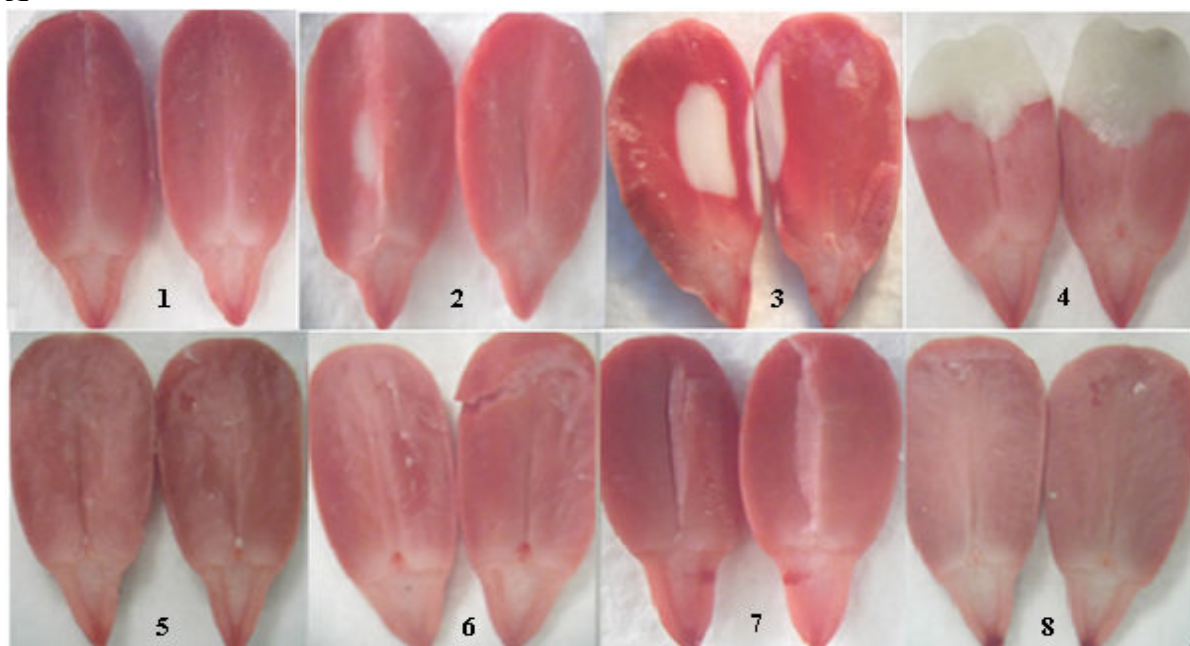
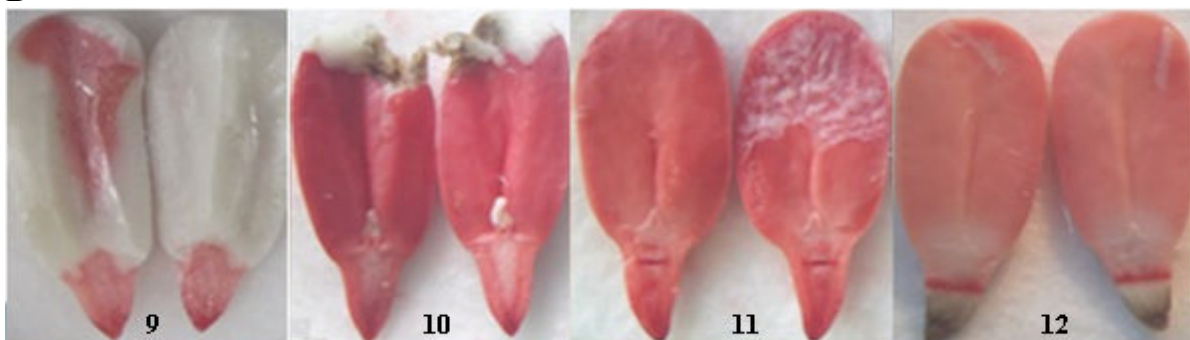
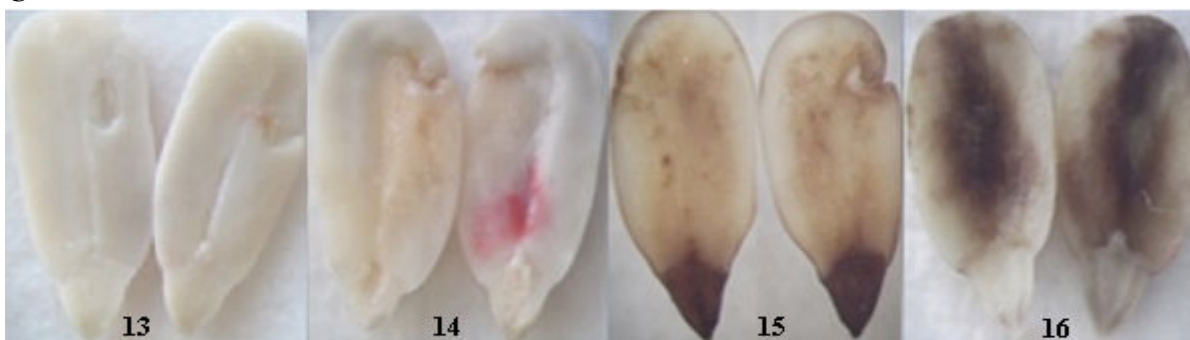
A**B****C**

Figura 2: Aspectos observados nas sementes de girassol submetidas ao teste de tetrazólio. **A)** Classe 1 sementes viáveis (1 – 8), **B)** Classe 2 sementes não viáveis (9 – 12) e **C)** Classe 3 sementes mortas (13 – 16).

Tabela 2: Viabilidade de sementes de girassol pelo teste de tetrazólio, com 16 e 18 h de hidratação a 25 °C, sob diferentes períodos de coloração em solução de tetrazólio na concentração de 0,1% a 30 °C.

Lotes	Hidratação por 16 h		
	Períodos de coloração		
	2 h	3 h	4 h
	-----%-----		
1	90 a	88 ab	94 a
2	94 a	92 a	90 a
3	89 a	84 b	87 a
4	89 a	86 b	89 a
CV (%)	3,6	3,4	5,4

Lotes	Hidratação por 18 h		
	Períodos de coloração		
	2 h	3 h	4 h
	-----%-----		
1	92 a	90 ab	90 a
2	94 a	93 a	93 a
3	88 a	83 b	88 a
4	89 a	88 ab	88 a
CV (%)	3,3	4,1	5,6

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3: Viabilidade de sementes de girassol pelo teste de tetrazólio, com 16 e 18 horas de hidratação a 25 °C, sob diferentes períodos de coloração em solução de tetrazólio na concentração de 0,5% a 30 °C.

Lotes	Hidratação por 16 h		
	Períodos de coloração		
	2 h	3 h	4 h
	-----%-----		
1	91 a	85 a	85 a
2	85 a	87 a	90 a
3	86 a	85 a	82 a
4	82 a	87 a	86 a
CV (%)	6,6	4,2	6,8

Lotes	Hidratação por 18 h		
	Períodos de coloração		
	2 h	3 h	4 h
	-----%-----		
1	79 b	87 a	92 a
2	86 a	88 a	87 ab
3	81 ab	84 a	82 b
4	78 b	83 a	86 ab
CV (%)	3,7	6,0	3,3

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 4: Viabilidade de sementes de girassol pelo teste de tetrazólio, com 16 e 18 horas de hidratação a 25 °C, sob diferentes períodos de coloração em solução de tetrazólio na concentração de 1,0% a 30 °C.

Lotes	Hidratação por 16 h		
	Períodos de coloração		
	1 h	2 h	3 h
	-----%-----		
1	81 a	86 ab	77 a
2	85 a	93 a	80 a
3	76 a	78 b	73 a
4	79 a	86 b	74 a
CV (%)	6,5	5,6	7,0
Lotes	Hidratação por 18 h		
	Períodos de coloração		
	1 h	2 h	3 h
	-----%-----		
1	90 a	88 a	87 a
2	91 a	90 a	83 ab
3	88 a	83 a	78 b
4	87 a	82 a	87 a
CV (%)	5,5	5,3	4,2

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4. CAPÍTULO II - VIGOR DE SEMENTES DE GIRASSOL DETERMINADO PELO TESTE DE TETRAZÓLIO

TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE GIRASSOL

RESUMO: Testes de vigor são cada vez mais empregados pela indústria sementeira para seleção de lotes de sementes, visando garantir a qualidade do produto comercializado. O teste de tetrazólio é um teste de vigor promissor, em razão da sua rapidez e por não ser influenciado pela dormência de sementes recém colhidas, muito observada em girassol. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do teste de tetrazólio para avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol e determinar classes de vigor para condução do teste. Para tanto, foram selecionados quatro lotes da cultivar BRS 122, os quais foram submetidos às seguintes determinações: grau de umidade, germinação, emergência de plântulas em campo e teste de tetrazólio. Para condução do teste de tetrazólio as sementes foram hidratadas diretamente em água por 16 h, a 25 °C, e coloridas na solução de tetrazólio com concentração de 0,1%, durante 3 h, a 30 °C. Foram obtidas cinco classes de qualidade: viáveis de alto vigor, viáveis de médio vigor, viáveis de baixo vigor, não viáveis e mortas. O teste de tetrazólio, com a metodologia testada, foi eficiente para avaliação do vigor de sementes de girassol.

Termo para indexação: *Helianthus annuus* L.; qualidade fisiológica e dormência.

VIGOUR OF SUNFLOWER SEEDS DETERMINED BY TETRAZOLIUM TEST

ABSTRACT: Vigor tests are increasingly used by the seed industry for the selection of seed lots in order to guarantee the quality of the product marketed. The tetrazolium test is test of vigour promising because of their speed and by not be influenced by the newly harvested seed dormancy, often observed in sunflower. The objective of this study was to evaluate the efficiency of the tetrazolium test for vigor evaluation of sunflower seeds and determining vigor classes for the test. To this end, were selected four sunflower seed lots BRS 122, which were submitted to the following determinations: moisture content, germination and seedling emergence in the field and tetrazolium test. For conducting the tetrazolium test the seeds were directly hydrated in water for 16 h at 25 ° C, and they were colored at tetrazolium solution in the concentration of 0.1% for 3 h at 30 ° C. Were obtained five quality classes: viable and high vigour, viable and medium vigour, viable and low vigour, non-viable and dead. The method tested for the tetrazolium test was efficient for vigor evaluation of sunflower seeds.

Index terms: *Helianthus annuus* L, physiological quality and dormancy.

4.1. INTRODUÇÃO

A semente é um dos principais insumos agrícolas e, com a exigência do mercado, a indústria sementeira tem implantado programas de controle de qualidade interno, visando garantir o alto desempenho do produto comercializado. Para tanto, diferentes ferramentas para avaliação do potencial fisiológico das sementes, principalmente para distinção de lotes de alto e baixo vigor tem sido utilizadas (Perry, 1980; McDonald, 1998; Hampton, 2002; TeKrony, 2003).

Diferentes testes têm sido avaliados para verificar a eficiência na distinção do vigor de sementes de girassol, destacando-se o teste de envelhecimento acelerado e o de condutividade elétrica (Albuquerque et al, 2001; Braz e Rossetto, 2009). No entanto, ambos os testes apresentam limitações, quer seja pela ocorrência de dormência, a qual impossibilita a avaliação do vigor pelo envelhecimento acelerado, ou como relatado por Albuquerque et al. (2001), pela influência do pericarpo na lixiviação de solutos, dificultando a avaliação e obtenção de resultados consistentes pelo teste de condutividade elétrica.

O teste de tetrazólio é um teste topográfico, não influenciado pela dormência das sementes, que possibilita a distinção de tecidos vivos e mortos, obtendo-se resultados do potencial fisiológico da semente em menos de 24 h. Além disso, pode ser empregado na avaliação da viabilidade (Bittencourt e Vieira, 1996; Deswal e Chand, 1997; ISTA, 2008; Brasil, 2009) e do vigor (Costa e Marcos Filho, 1994; Santos et al., 2007).

Dentre as recomendações existentes para sementes de girassol, observa-se que a abordagem do teste de tetrazólio é direcionada para avaliação da viabilidade das sementes (Lisakowski, 1981; ISTA, 2003; Brasil, 2009), não sendo verificada na literatura recomendações para determinação do seu vigor. Sabe-se que os testes de vigor identificam e classificam lotes de sementes, subsidiando decisões para o adequado armazenamento e a comercialização (Marcos Filho, 1994; TeKrony, 2003). No caso do girassol, o teste de tetrazólio assume maior relevância em determinar o potencial fisiológico das sementes com período de armazenamento inferior a 40 dias, quando o grau de dormência normalmente é mais acentuado.

Baseado no exposto, o trabalho teve por finalidade verificar a eficiência do teste de tetrazólio para avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol e determinar classes de vigor para condução do teste.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba-PR, durante o período de junho a outubro de 2011.

Foram utilizadas sementes (aquênios) de girassol da cultivar BRS 122, produzidas na safra 2010/2011. As amostras de sementes foram homogeneizadas em divisor centrífugo (Brasil, 2009), divididas igualmente em quatro subamostras e armazenadas em sacos de papel, tipo Kraft, em ambiente controlado ($16^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 55% de UR), durante todo período experimental.

Avaliou-se inicialmente a qualidade de 12 lotes de sementes de girassol, sendo posteriormente selecionados quatro lotes com potenciais fisiológicos distintos, os quais foram submetidos às seguintes determinações:

- **Determinação do grau de umidade:** realizada pelo método de estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 h, com duas amostras de 5 g de sementes por lote. Os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida), conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes - R.A.S. (Brasil, 2009).

- **Teste de germinação:** conduzido após o armazenamento por quatro meses sob temperatura de $16^{\circ}\text{C} \pm 2$ e 55% de umidade relativa do ar, quando então foi observada a completa superação da dormência das sementes. Foram utilizadas quatro repetições de 100 sementes, subdivididas em quatro subamostras de 25, totalizando 400 sementes por lote, distribuídas em rolo de papel toalha umedecido com água, na quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco, mantidos em germinador, tipo Mangelsdorf, sob temperatura de 25°C . A avaliação foi realizada no sétimo dia após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem média de plântulas normais (Brasil, 2009).

- **Emergência de plântulas em campo:** foi conduzida na área experimental do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR, utilizando-se quatro repetições de 100 sementes, totalizando 400 sementes para cada lote, distribuídas equidistantemente em cinco linhas espaçadas entre si por cinco centímetros, com profundidade de aproximadamente quatro centímetros. A avaliação ocorreu quando as plântulas alcançaram a fase de VE

conforme descrito por Castro e Farias, 2005. Os resultados foram expressos em porcentagem média das plântulas emergidas.

Para o estudo das classes de vigor do teste de tetrazólio, utilizaram-se quatro repetições de 100 sementes, totalizando 400 sementes por lote. Os seguintes procedimentos foram realizados:

- **Hidratação e preparo:** imersão direta em de água por 16 h a 25 °C, seguida da retirada do pericarpo e tegumento por meio de corte longitudinal entre os cotilédones, na região distal ao eixo embrionário, em profundidade de até 1/3 do comprimento total do aquênio. Após o período de hidratação, determinou-se o grau de umidade das sementes pelo método da estufa, conforme descrito anteriormente.

- **Coloração:** os embriões foram imersos em 10 mL de solução de tetrazólio, na concentração de 0,1%, durante 3 h no escuro, a 30°C.

Após o período de coloração, as sementes foram retiradas da solução, lavadas em água corrente e mantidas submersas em água até o momento da avaliação, quando então foram seccionadas longitudinalmente entre os cotilédones, com auxílio de lâmina de aço inox, obtendo-se duas metades do embrião.

A avaliação foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico, observando os tecidos externos e internos de ambas as metades do embrião quanto à localização, extensão e intensidade da coloração, dando ênfase às áreas vitais das sementes. Os tecidos que apresentaram coloração vermelho carmim (rosa) normal foram considerados viáveis; os que permaneceram com a cor vermelho carmim intenso, considerados tecidos em deterioração; aqueles sem coloração (branco) ou com aspecto leitoso (mole), foram considerados mortos (Delouche, 1976; ISTA, 2003; Brasil, 2009). Com base nesses critérios, foram obtidas as classes de vigor.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo os resultados submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Realizou-se o teste de correlação de Spearman, comparando-se os resultados obtidos na avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio com o teste de germinação, bem como entre o vigor determinado pelo teste de tetrazólio e a emergência de plântulas em campo. Para análise de variância e comparação de médias, utilizou-se o programa estatístico ASSISTAT, versão 7.6 beta (Silva, 2011). Já para correlação de Spearman, aplicou-se o programa estatístico Mstat versão 5.4.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela Tabela 5 pode-se observar que os lotes eram uniformes quanto ao grau de umidade inicial, característica importante para obtenção de resultados consistentes (Marcos Filho, 1999). Desse modo, a homogeneidade inicial contribuiu para que a absorção de água pelas sementes após 16 h de hidratação (Tabela 5) também tenha sido uniforme, sendo que o grau de umidade final variou de 51,0 a 53,7%.

No teste de germinação (Tabela 5) verificou-se que os lotes 1 e 2 foram classificados como de potencial superior e o lote 3 como o de menor qualidade. Os resultados obtidos na avaliação da emergência de plântulas em campo (Tabela 5) ressaltou a superioridade do lote 2 e o menor desempenho do lote 3, ficando os lotes 1 e 4 em posição intermediária.

Os valores obtidos no teste de germinação foram inferiores aos determinados pela emergência de plântulas em campo para todos os lotes, sendo esta diferença em média de 10%. Isto ocorreu pelo fato das condições de condução do teste de germinação (substrato papel, ambiente de alta Umidade Relativa) ser favorável ao desenvolvimento de fungos associados às sementes, o que não ocorreu quando as sementes foram levadas ao campo, sendo também descartada a hipótese de dormência.

Para a distinção das classes de vigor pelo teste de tetrazólio foram considerados os seguintes critérios:

- Classe 1 - sementes de alto vigor (Figura 3 A): tecidos firmes com coloração uniforme (vermelho carmim) em toda a extensão do embrião (1 e 2), ou quando apresentaram danos não significativos para o estabelecimento de plântulas normais (3-5). Assim, para que as sementes fossem classificadas nesta classe, os danos tolerados foram aqueles que totalizaram área de até 1/3 sem colorir a extremidade superior de apenas um dos cotilédones (3), ou área inferior a 1/3 na extremidade das plúmulas com coloração vermelho carmim mais intenso (4), e ainda presença de pequenos sinais (pontos) com coloração mais intensa na região do eixo hipocótilo-radícula (5), porém sem que estes tenham atingido a região do cilindro central.

- Classe 2 – sementes de médio vigor (Figura 3 B): cotilédones que apresentaram coloração vermelho carmim mais intenso superficialmente (6); danos em área de até 1/3 da extremidade de ambos os cotilédones (7); dano na região vascular central em um dos cotilédones (8), desde que este não tenha atingido a região de união entre o cotilédone e o eixo embrionário; quando as plúmulas apresentarem coloração mais intensa em área de até 1/2

a partir de sua extremidade (9), ou ainda quando a coloração mais intensa atingiu área de até 1/3 a partir da extremidade da radícula (10), sem que o cilindro central tenha sido comprometido.

- Classe 3 – sementes de baixo vigor (Figura 3 C): danos de até ½ dos cotilédones (região sem colorir) (11), danos presentes na região vascular em ambos os cotilédones (12), desde que não tenha atingido a região de união entre os cotilédones e o eixo embrionário; região sem colorir até ½ da extremidade das plúmulas (13); danos na região do hipocótilo-radícula (14), desde que estes atinjam uma extensão inferior a ½ do cilindro central, ou ainda quando ocorrer a presença de tecido sem coloração em área de até 1/3 a partir da extremidade da radícula (15), sem que o cilindro central tenha sido comprometido.

- Classe 4 – sementes não viáveis (Figura 3 D): foram aquelas que apresentaram danos superiores a ½ da área total dos cotilédones (16), ou quando estes atingiram a região de união dos cotilédones ao eixo embrionário (17); coloração vermelho intenso em toda a extensão do embrião; danos superiores a ½ das plúmulas (18); danos na região do cilindro central (19), e danos que atingirem mais de 1/3 da extremidade da radícula comprometendo o cilindro central (20).

- Classe 5 – sementes mortas (Figura 3 E): sementes que não apresentaram coloração em toda a extensão do embrião (21), com tecidos flácidos (mole) (22), ou ainda com regiões escuras apresentando adiantado estágio de deterioração (23-25).

O total de sementes classificadas dentro das duas primeiras classes representou os valores de vigor, enquanto que a viabilidade foi composta pela soma das três primeiras classes. As classes 4 e 5 somaram o total de sementes não viáveis.

Os resultados obtidos no teste de tetrazólio (TZ) podem ser observados na Tabela 6. Pela análise da viabilidade, o teste conseguiu separar os lotes de forma semelhante ao teste de germinação, classificando os lotes 1 e 2 como de potencial fisiológico superior em relação aos lotes 3 e 4. Com relação à avaliação do vigor, o teste de tetrazólio, assim como o de emergência de plântulas em campo, possibilitou separar o lote 2 como o de maior vigor em relação ao lote 3, enquanto que os lotes 1 e 4 foram considerados de médio vigor.

De acordo com Perry (1980), um teste de vigor tem como principal objetivo a distinção de lotes com alto e baixo vigor e, para que venha a ter validade, o teste deve apresentar resultados semelhantes à emergência em campo. Assim, pelos resultados obtidos pode-se dizer que a avaliação das sementes de girassol pelo teste tetrazólio (TZ) foi eficiente, visto que os resultados foram condizentes tanto para análise da viabilidade quanto do vigor.

Esta constatação pode ser salientada por meio da correlação entre os testes (Tabela 7), onde foi obtida correlação perfeita ($\rho = 1,0$) entre tetrazólio (viabilidade) e teste de germinação e entre tetrazólio (vigor) e emergência de plântulas em campo.

Neste sentido, o teste de tetrazólio pode ser utilizado na avaliação do vigor das sementes de girassol, uma vez que a sua elevada correlação com a emergência de plântulas em campo confere confiabilidade para a classificação de lotes.

4.4. CONCLUSÃO

O teste de tetrazólio é eficiente para avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol, sendo determinadas cinco classes de qualidade para a condução do teste: sementes de alto vigor (Classe 1); sementes de médio vigor (Classe 2); sementes de baixo vigor (Classe 3); sementes não viáveis (Classe 4) e sementes mortas (Classe 5).

4.5. AGRADECIMENTOS

A Embrapa - Soja pelo apoio e concessão das sementes utilizadas no trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

4.6. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.C.F.E.; MORO, F.V.; FAGIOLI, M.; RIBEIRO, M.C. Teste de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.1-8, 2001. <http://www.abrates.org.br/portal/revista/artigos-publicados>.

BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D.. Use of reduced concentrations of tetrazolium solutions for the evaluation of the viability of peanut seed lots. **Seed Science and Technology**, v.2, n.1, p.75-82, 1996.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

BRAZ, M.R.S.; ROSSETTO, C.A.V. Correlação entre testes para avaliação da qualidade de sementes de girassol e emergência das plântulas em campo. **Ciência Rural**, v.39, n.7, p.2004-2009, 2009. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v39n7/a283cr891.pdf>.

CASTRO, C.; FARIAS, J.R.B. Ecofisiologia do girassol. In: LEITE, R.M.V.B.C.; BRIGHENTI, A.M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Embrapa Soja, Londrina. p.163-218, 2005.

COSTA, N.P; MARCOS FILHO, J. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seeds. **Seed Science and Technology**, v. 22, n.1, p. 9-17, 1994.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Tradução de Flávio Rocha. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103 p.

DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v.25, n.3, p.409-417, 1997.

HAMPTON, J. G. What is seed quality? **Seed Science and Technology**, v.30, n.1, p.1-10, 2002.

ISTA - International Seed Testing Association. **Working Sheets on Tetrazolium Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2003.

ISTA – International Seed Testing Association. Biochemical test for viability: the topographical tetrazolium test. In: **Chapter 6: International rules for seed testing**. Ed. 2008. Bassersdorf, 2008. p.6.1-6-30

LISAKOWISKI, D. **Tetrazolium evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed**. Mississippi: Mississippi State University, 1981. 74p. (Dissertação de Mestrado).

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.4, n.2, p.33-35, 1994.

McDONALD M. B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, v. 8, n. 2, p. 265-276, 1998.

PERRY, D.A. The concept of seed vigour and its relevance to seed production techniques. In: Hebblethwaite, P.D. **Seed production**. Butterworth, London, 1980. p.585-591.

SANTOS, M.A.O.; NOVENBRE, A.D.L.C.; MARCOS FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, v.35, n.1, p.213-223, 2007. <http://www.ingentaconnect.com/content/ista/sst/2007/00000035/00000001/art00019>.

SILVA, F. A. S. **Sistema de Assistência Estatística – ASSISTAT versão 7.6 beta**. Departamento de Engenharia Agrícola (DEAG) do CTRN da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Campina Grande – PB, 2011. <http://www.assistat.com/>.

TEKRONY, D.M. Precision is an essential component in seed vigour testing. **Seed Science and Technology**, v.31, n.2, p.435-447, 2003.

<http://www.ingentaconnect.com/content/ista/sst/2003/00000031/00000002/art00020>.

Tabela 5: Resultados médios do grau de umidade inicial (GUI) e após 16 h de hidratação (GUhi), da germinação (G) e da emergência de plântulas em campo (EC), de quatro lotes de sementes de girassol da cultivar BRS122.

Lotes	GUI	GUhi	G	EC
	-----%-----			
1	8,4	51,0	85 a	94 ab
2	8,6	51,3	86 a	95 a
3	8,2	53,7	76 b	87 c
4	8,4	52,3	81 ab	92 b
CV (%)	--	--	4,9	1,29

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6: Resultados do teste de tetrazólio viabilidade (TZ-VB) e vigor (TZ-V) de sementes de girassol após 16 horas de hidratação e coloração em solução na concentração de 0,1% por três horas, a 30 °C.

Lotes	TZ-VB	TZ-V
	-----%-----	
1	91 a	77 b
2	92 a	82 a
3	82 b	68 c
4	86 b	74 b
CV (%)	1,94	2,08

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7: Resultados da correlação de Spearman entre o TZ-Viabilidade (TZ-VB) e Germinação (G), e entre TZ-Vigor (TZ-V) e emergência de plântulas em campo (EC).

Correlação	Coefficiente de correlação (ρ)
TZ-VB x G	1,00*
TZ-V x EC	1,00*

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p = 0,041$)

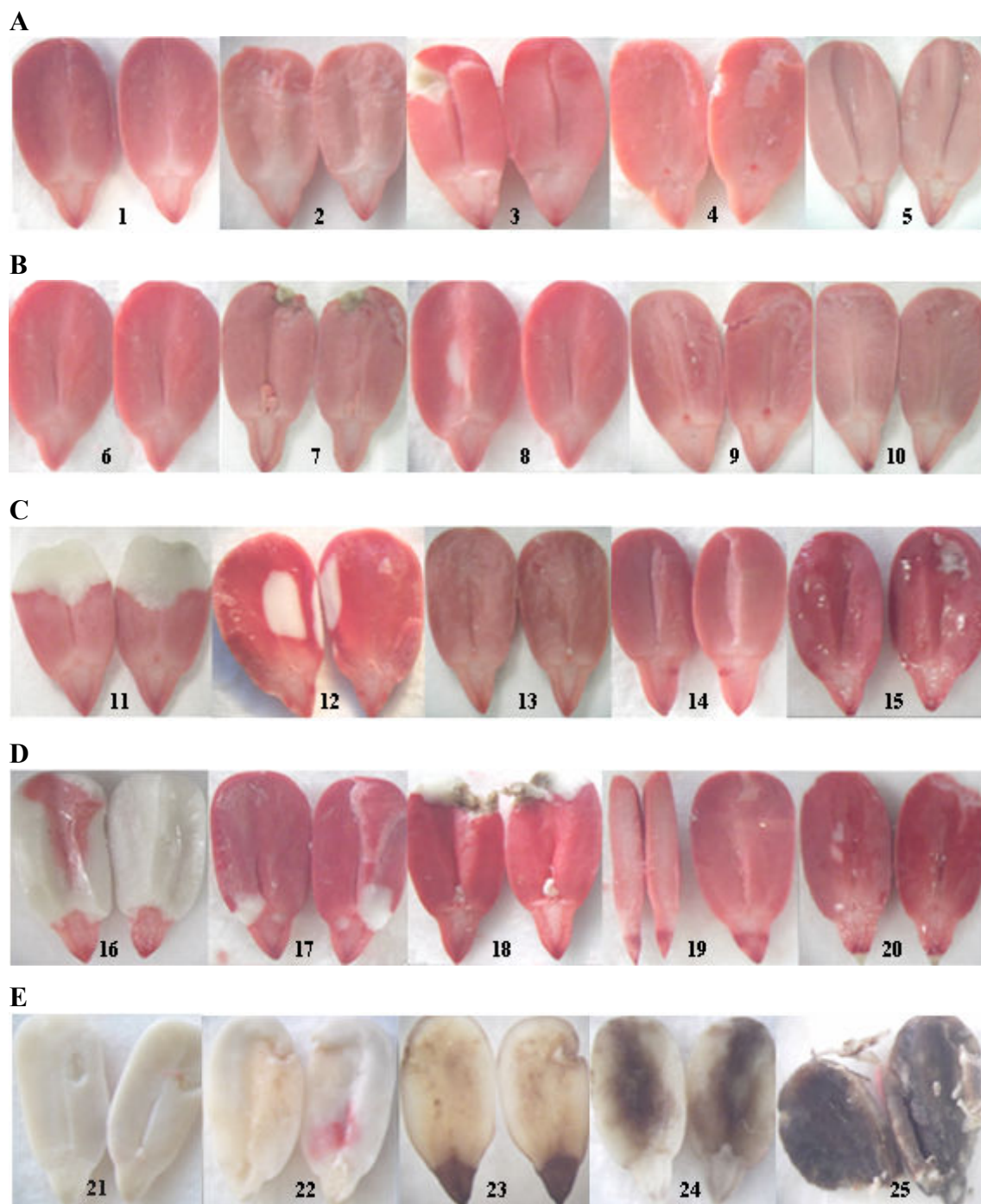


Figura 3: Classes de vigor obtidas pelo teste de tetrazólio para sementes de girassol (aumento de 1,6x no microscópio estereoscópico): **(A)** Classe 1 sementes de alto vigor (1-5); **(B)** Classe 2 sementes de médio vigor (6-10); **(C)** Classe 3 sementes de baixo vigor (11-15); **(D)** Classe 4 sementes não viáveis (16-20); **(E)** Classe 5 sementes mortas (21-25).

5. CONCLUSÕES GERAIS

O teste de tetrazólio é eficiente para avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol aplicando-se a seguinte metodologia:

- hidratação das sementes por imersão direta em água (a 25 °C/16 h);
- remoção do pericarpo e tegumento por meio de corte longitudinal entre os cotilédones na região distal ao eixo embrionário, em profundidade de até 1/3 do comprimento total do aquênio;
- coloração dos embriões por imersão em solução de tetrazólio a 0,1%, por 3 h, a 30°C.

É possível identificar diferentes classes de qualidade, viabilidade e vigor, em sementes de girassol por meio do teste de tetrazólio.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

ALBUQUERQUE, M. C. F. E.; MORO, F. V.; FAGIOLI, M.; RIBEIRO, M. C. Teste de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p.1-8, 2001.

BARROS, D. I.; DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. S.; ARAÚJO, E.F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 165-171, 2005.

BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego, USA, Academic Press, 1998, 666 p.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, n. 1, p.1-16, 2004.

BHERING, M. C.; DIAS, D. C. F. S.; BARROS, D. I. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica das sementes de melancia. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 176-182, 2005.

BHERING, M.C.; SILVA, R.F.; ALVARENGA, E.M.; DIAS, D.C.F.S. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de feijão. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

BIANCO, J.; GARELLO, G.; LE PAGE-DEGIVRY, M. T. Release of dormancy in sunflower embryos by dry storage: involvement of gibberellins and abscisic acid. **Seed Science Research**, v. 04, n. 2, p. 57-62, 1994.

BITTENCOURT, S.R. M.; VIEIRA, R.D. Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Amendoim. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

BONACIN, G. A.; RODRIGUES, T. J. D.; CRUZ, M. C. P.; BANZATTO, A. D. Características morfofisiológicas de sementes e produção de girassol em função do boro no solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 111-116, 2009.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa n. 25, 16 de dezembro de 2005**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 10 de outubro de 2011.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: **Germinação: do básico ao aplicado**. FERREIRA, A. G.; BORGUET, F. Porto Alegre-RS, ARTMED, 2004. 323p.

CARVALHO, L. F. SEDIYAMA, C. S.; REIS, M. S.; DIAS, D. C. F.; MOREIRA, M. A. Influência da temperatura de embebição da semente de soja no teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.1, p.09-17, 2009.

CARVALHO, N.M. Vigor de sementes. In: CÍCERO, S.M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R. (Ed.). **Semana de atualização em produção de sementes**, Piracicaba, 1986. p.207-223

CHAMMA, H. M. C. P.; NOVENBRE, A.D. L. C. Teste de Tetrazólio para as sementes de milho: períodos de hidratação e de coloração das sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p. 125-129, 2007.

CLEMENTE, A. C. S.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M.; ZEVIANI, W. M. Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.1, p.38-44, 2011.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 07 de outubro de 2011.

COSTA, N. P.; MARCOS FILHO, J. Alternative methodology for the tetrazolium test for soybean seeds. **Seed Science and Technology**, v.22, n.1, p.9-17, 1994.

COSTA, N. P.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja – Série Sementes. **Circular Técnica 39**. Embrapa. Londrina-PR, 2007, 8 p.

COSTA, C. J.; SANTOS, C. P. Teste de Tetrazólio em sementes de leucena. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p.66-72, 2010.

DALL'AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C. Origem e histórico do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Embrapa Soja, Londrina-Pr, 2005. 641 p.

DELOUCHE, J. C.; STILL, T. W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Tradução de Flávio Rocha. Brasília, AGIPLAN, 1976. 103 p.

DEMINICIS, B. B.; VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Clitoria ternatea* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.54-62, 2009.

DIAS, D. C. F. S. **Dormência em Sementes: mecanismos de sobrevivência das espécies**. SEED News. ano. IX n. 4, 2005. Disponível em: <http://www.seednews.inf.br/_html/site/content/edicoes_antigos/edicoes_antigas.php?codigo=94&janela=reportagemCapa>. Acesso em: 08 de outubro de 2011.

DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.152-158, 2008a.

DIAS, M. C. L. L.; ALVES, S. J. Avaliação da viabilidade de sementes de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich) Stapf pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.145-151, 2008b.

DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Milho. In. KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

DICKMANN, L; CARVALHO, M. A. C.; BRAGA, L.F.; SOUSA, M.P. Comportamento de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) submetidas a estresse salino. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v.3, p.64-75, 2005.

FRANÇA NETO, J. B.; POLA, J. N.; PALUDZYSZYN FILHO, E.; COSTA, N. P.; DIAS, M. C. L. L.; PEREIRA, L. A. G.; HENNING, A. A.; BORDIN, A. P. A. **Estudo preliminar sobre a inibição da dormência em sementes de girassol**. Congresso Brasileiro de Sementes, Campinas-SP, Resumo de trabalhos técnicos. Brasília, ABRATES, 1983. 189 p.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. **O teste de tetrazólio em sementes de soja**. Embrapa. Londrina - PR, 1998. 72p. (Embrapa - CNPSo. Documentos, 116).

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; COSTA, N. P. Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Soja. In. KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

FRANÇA NETO, J. B. Testes de Tetrazólio para Determinação do Vigor das sementes. In. KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.186-196, 2010.

ISTA - International Seed Testing Association. **Working Sheets on Tetrazolium Testing**. Bassersdorf: ISTA, v.1, 2003.

ISTA - International Seed Testing Association. Understanding seed vigour. Prepared by ISTA Vigour Test Committee, 1995. Disponível em: <http://www.seedtest.org/upload/prj/product/UnderstandingSeedVigourPamphlet.pdf>. Acesso em: 06 de outubro de 2011.

ISTA – International Seed Testing Association. Biochemical test for viability: the topographical tetrazolium test. In: **Chapter 6: International rules for seed testing**. Ed. 2008. Bassersdorf, 2008. p.6.1-6-30

LAZZAROTTO, J. J.; ROESSING, A. C.; MELLO, H. C. O agronegócio do girassol no mundo e no Brasil. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Embrapa Soja, Londrina-Pr, 2005. 641 p.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia Sclerotiorum* em girassol e soja**. Comunicado Técnico n.76. Embrapa, 2005. 3p.

LIMA, L. B. S.; PINTO, T. L. F.; NOVENBRE, A. D. L.C. Avaliação da viabilidade e vigor de sementes de pepino pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.60-68, 2010.

MARCOS FILHO, J. Utilização de testes de vigor em programas de controle de qualidade de sementes. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.4, n.2, p.33-35, 1994.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARCOS FILHO, J.; KOMATSU, Y. H.; BARZAGHI, L. Métodos para superação a dormências de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.09, n.2, p.65-74, 1987.

McDONALD, M. B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, v.8, n.2, p.265-276, 1998.

MURCIA, M.; PERETTI, A.; MARTINO, S. S.; PÉREZ, A.; LONGO, O. D.; ARGÜLLO, J.; PEREIRA, V. Vigor e emergência em campo de sementes de girassol com alto teor de ácido oléico, no sudeste da Província de Buenos Aires. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.1, p.129-133, 2002.

OLIVEIRA, L. M.; CARVALHO, M. L. M.; DAVIDE, A. C. Teste de tetrazólio para avaliação das sementes de *Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert – Leguminosae Caesalpinioideae. **Cerne**, v.11, n.2, p.159-166, 2005.

PINTO, T. L. F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; GOMES, F. G. J. Avaliação da viabilidade das sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios x. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.195-201, 2009.

RIBEIRO, L. M.; GARCIA, Q. S.; OLIVEIRA, D. M. T.; NEVES, S. C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.4, p.361-368, 2010.

ROSSI, R.. O. **Girassol**. Curitiba: R. O. Rossi, 1998. 333p.

SANTOS, L. T.; PINTO, R. J. B.; FRANCO, F. A.; SCHUSTER, I. Inheritance and potential use of grain color in the identification of genotypes resistant to pre-harvest sprouting in wheat. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p.218-224, 2010.

SANTOS, M. A. O.; NOVENBRE, A. D. L. C.; MARCOS FILHO, J. Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. **Seed Science and Technology**, v.35, n.1, p.213-223, 2007.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. de C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia preta pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.3, p.57-62, 2009.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. de C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia branca pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.4, p.174-180, 2010a.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. de C.; GAVAZZA, M. I. A.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium Test for Evaluating Triticale Seed Viability. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3, p.163-169, 2010b.

TEKRONY, D.M. Precision is an essential component in seed vigour testing. **Seed Science and Technology**, v.31, n.2, p.435-447, 2003.

VIEIRA, M.G.G.C.; VON PINHO, E. V. R. Metodologia do Teste de Tetrazólio em Sementes de Algodão. In. KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J.B. (ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218p.

VIEIRA, O. V. **Ponto de maturação ideal para colheita do girassol visando alta qualidade da semente**. Curitiba, 2005. 79 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná.

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>> Acesso em: 07 de outubro de 2011a.

USDA - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>>. Acesso em: 07 de outubro de 2011b.